

Aus dem Institut für Virologie  
Leiter: Prof. Dr. Stephan Becker

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



# **Die Phosphorylierung des Ebolavirus VP30 reguliert die virale Transkription und Replikation**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Humanbiologie (Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

**Nadine Biedenkopf  
aus Laubach**

**Marburg, Januar 2012**

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

27.01.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Stephan Becker

1. Korreferent: Prof. Dr. Alexander Brehm

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis .....	I
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Taxonomie.....	1
1.2 Epidemiologie.....	2
1.3 Pathogenese.....	4
1.4 Morphologie und Zusammensetzung .....	5
1.5 Viraler Replikationszyklus.....	7
1.6 Reverse Genetik von Ebolaviren .....	11
1.6.1 Ebolavirus-spezifischer infektiöser <i>virus-like particle</i> (iVLP)-Assay.....	11
1.6.2 Generierung von rekombinantem Ebolavirus .....	13
1.7 VP30 als EBOV-spezifischer Transkriptionsfaktor .....	14
1.8 Fragestellung der Arbeit.....	16
<b>2 Material.....</b>	<b>17</b>
2.1 Chemikalien.....	17
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	18
2.3 Kits.....	19
2.4 Geräte.....	19
2.5 Puffer und Lösungen .....	20
2.5.1 Puffer.....	20
2.5.2 Lösungen .....	21
2.6 Wachstumsmedien.....	21
2.6.1 Wachstumsmedien für Bakterien .....	21
2.6.2 Wachstumsmedien für Säugerzellen.....	22
2.7 Nukleinsäuren und Nukleotide .....	23
2.7.1 Nukleinsäuren als Größenmarker .....	23
2.7.2 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide .....	23
2.7.3 DNA-Oligonukleotide (Primer für Sequenzierungen / Mutagenesen) .....	23
2.8 Vektoren und rekombinante Plasmide .....	24
2.8.1 Vektoren.....	24
2.8.2 Rekombinante Plasmide.....	24
2.9 Proteine, Peptide und Aminosäuren.....	25
2.9.1 Enzyme .....	25

2.9.2	Antikörper .....	25
2.9.3	Affinitätsgele .....	26
2.9.4	Proteinmarker .....	26
2.10	Zellen .....	27
2.10.1	Prokaryotische Zellen .....	27
2.10.2	Eukaryotische Zellen .....	27
2.11	Verwendete Software .....	27
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>28</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	28
3.1.1	Amplifikation von DNA-Sequenzen durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)....	28
3.1.2	Kolonie-Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
3.1.3	Ortsgerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese.....	29
3.1.4	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	30
3.1.5	Reverse Transkription und RealTime Polymerase-Kettenreaktion .....	31
3.1.6	Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	32
3.1.7	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren .....	33
3.1.8	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	34
3.1.9	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren .....	34
3.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren .....	35
3.1.11	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen.....	35
3.1.12	Anzucht und Selektion rekombinanter Bakterien.....	36
3.1.13	Isolierung von Plasmid - DNA aus Bakterien .....	36
3.1.14	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren.....	36
3.1.15	DNA-Sequenzierung .....	37
3.2	Zellbiologische Methoden .....	37
3.2.1	Kultivierung von HEK293-, HuH7- und VeroE6- Zellen .....	37
3.2.2	Transiente DNA-Transfektion mit TransIT® .....	37
3.2.3	Ernte von Zellen zur Analyse im Western Blot.....	38
3.2.4	Immunpräzipitation mit anti- <i>flag</i> und anti- <i>Ha</i> Agarose.....	39
3.2.5	Infektiöser Ebolavirus spezifischer VLP-Assay.....	39
3.3	Virologische Methoden .....	42
3.3.1	Reverse Genetik von rekombinantem EBOV.....	42
3.3.2	Anzucht und Konzentrierung von Viren .....	42
3.3.3	Bestimmung der Virustiter: TCID <sub>50</sub> -Assay.....	43
3.3.4	Infektion mit rekombinantem Ebolavirus .....	43

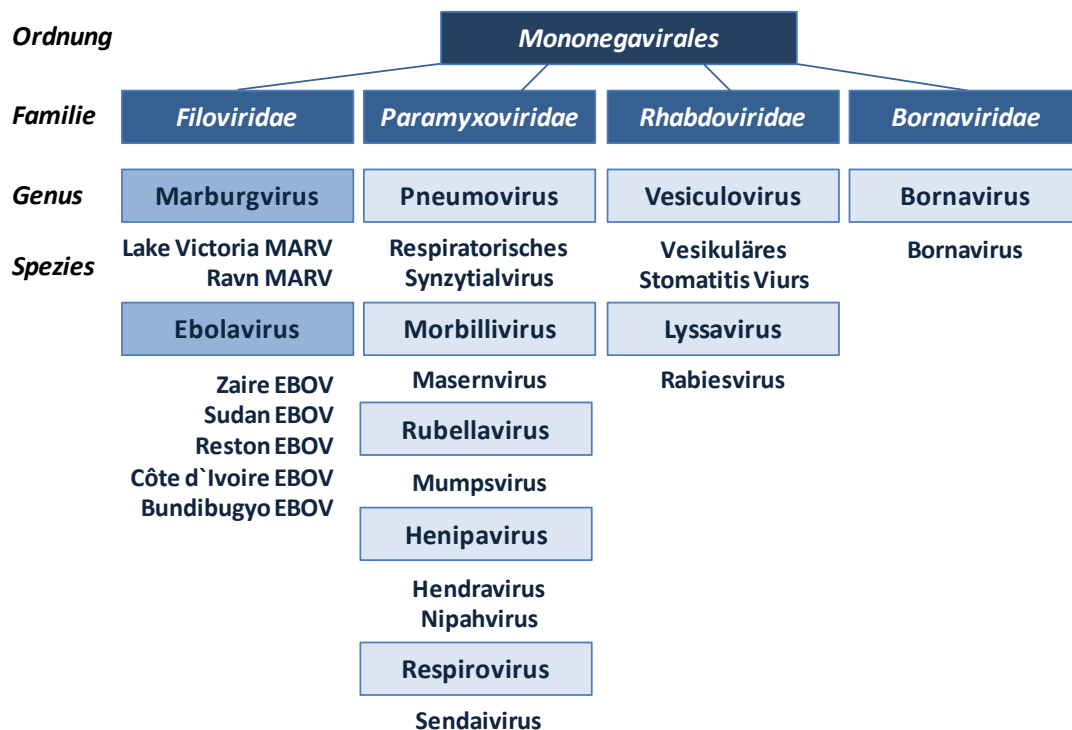
3.3.5	Immunoplaque-Assay.....	44
3.4	Biochemische und immunologische Methoden.....	44
3.4.1	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse .....	44
3.4.2	Elektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE) .....	46
3.4.3	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot) .....	46
3.4.4	Silberfärbung von Proteinen .....	48
3.4.5	Vorbereitung von Proben für die Elektronenmikroskopie (Negativkontrastierung) .....	48
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
4.1	Einfluss der Phosphorylierung des VP30 auf den Übergang von viraler Transkription zu viraler Replikation.....	49
4.1.1	Einfluss der Phosphorylierung des VP30 auf die virale Transkription bei unterdrückter Replikation .....	50
4.1.2	Einfluss einer permanenten Phosphorylierung des VP30 auf die virale Transkription in Anwesenheit von VP30_wt .....	51
4.1.3	Einfluss der Phosphorylierung des VP30 auf die virale Replikation .....	52
4.1.4	Einfluss der Phosphorylierung auf die Homooligomerisierung des VP30 .....	55
4.1.5	Einfluss der Phosphorylierung des VP30 auf die Interaktion mit NP .....	56
4.1.6	Einfluss der VP30-NP Interaktion auf die virale Transkription .....	57
4.1.7	Die Interaktion des VP30 mit VP35 .....	60
4.1.8	Einfluss der Phosphorylierung des VP30 auf die Interaktion mit VP35 .....	62
4.2	Die Rolle der dynamischen Phosphorylierung des VP30 für die primäre virale Transkription .....	64
4.2.1	Einfluss der dynamischen Phosphorylierung singulärer Serinreste des VP30 auf die Primäre Transkription im iVLP-Assay .....	64
4.2.2	Generierung von rekombinanten Ebolaviren.....	67
4.2.3	Morphologische Charakterisierung der rekombinanten Ebolaviren und deren Plauebildung.....	71
4.2.4	Wachstumsverhalten der rekombinanten Ebolaviren .....	73
4.2.5	Auftreten von Revertanten des recEBOV_S30 .....	75
4.2.6	Charakterisierung der Phosphorylierung des VP30 Serinrestes 29 mit Hilfe eines phosphospezifischen Peptidantikörpers nach rekombinanter Expression .....	77
4.2.7	Charakterisierung der Phosphorylierung des VP30 Serinrestes 29 im rekombinanten EBOV_S29 .....	81
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>86</b>
5.1	Die Rolle der Phosphorylierung des VP30 für den Übergang von viraler Transkription zu viraler Replikation.....	86

5.2	Die Rolle der dynamischen Phosphorylierung des Serinrest 29 für den viralen Lebenszyklus.....	90
5.3	Arbeitsmodell für die Funktion der Phosphorylierung des VP30 während Transkription und Replikation des EBOV .....	94
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>115</b>
<b>12</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>116</b>
<b>13</b>	<b>Verzeichnis der Akademischen Lehrer .....</b>	<b>118</b>
<b>14</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>119</b>
<b>15</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>120</b>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 TAXONOMIE

Das Ebolavirus (EBOV) bildet zusammen mit dem Marburgvirus (MARV) die Familie der *Filoviridae* (Filoviren). Filoviren besitzen ihren Namen aufgrund ihres filamentösen Erscheinungsbildes (lat. *filum* = Faden). Ihr einzelsträngiges, nicht-segmentiertes RNA-Genom mit negativer Polarität gruppiert sie gemeinsam mit Vertretern der Virusfamilien *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* und *Bornaviridae* in die Ordnung *Mononegavirales* (Abb 1).



**Abbildung 1: Taxonomie von Filoviren.** Für die Genera von *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* und *Bornaviridae* sind jeweils nur die wichtigsten Virusspezies angegeben. In Anlehnung an (82, 203).

Das Genus EBOV wird in fünf Spezies unterteilt: die humanpathogenen Vertreter Zaire Ebolavirus (ZEBOV), Sudan Ebolavirus (SEBOV), Bundibugyo Ebolavirus (BEBOV), Côte d'Ivoire Ebolavirus (CIEBOV) sowie das nicht-humanpathogene Reston Ebolavirus (REBOV). Dem Genus MARV weist man zwei Spezies zu: Lake Victoria MARV und Ravn MARV. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Spezies hinsichtlich ihrer Pathogenität, ihrer geographischen Herkunft und ihrer Sequenzhomologie.

## 1.2 EPIDEMIOLOGIE

Erstmals beschrieben wurden Filoviren 1967, als Laborarbeiter in Marburg, Frankfurt und Belgrad nach Kontakt mit Grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) an einem schweren hämorrhagischen Fieber erkrankten (127). Das isolierte Virus wurde nach der Stadt der Erstbeschreibung Marburgvirus (MARV) genannt. Im Folgenden kam es zu größeren Ausbrüchen von MARV zwischen 1998 und 2000 in der Demokratischen Republik Kongo (154 Fälle, 83 % Letalität) sowie 2004/2005 in der Region Uige, Uganda, mit Letalitätsraten von 88 % bei 374 beschriebenen Fällen (3, 41). Seither traten vereinzelte MARV-Infektionen auf: Im Jahr 2007 erkrankten drei Minenarbeiter in Uganda, außerdem infizierten sich 2008 eine niederländische sowie eine amerikanische Touristin nach dem Besuch einer Höhle in Uganda (2, 192, 194).

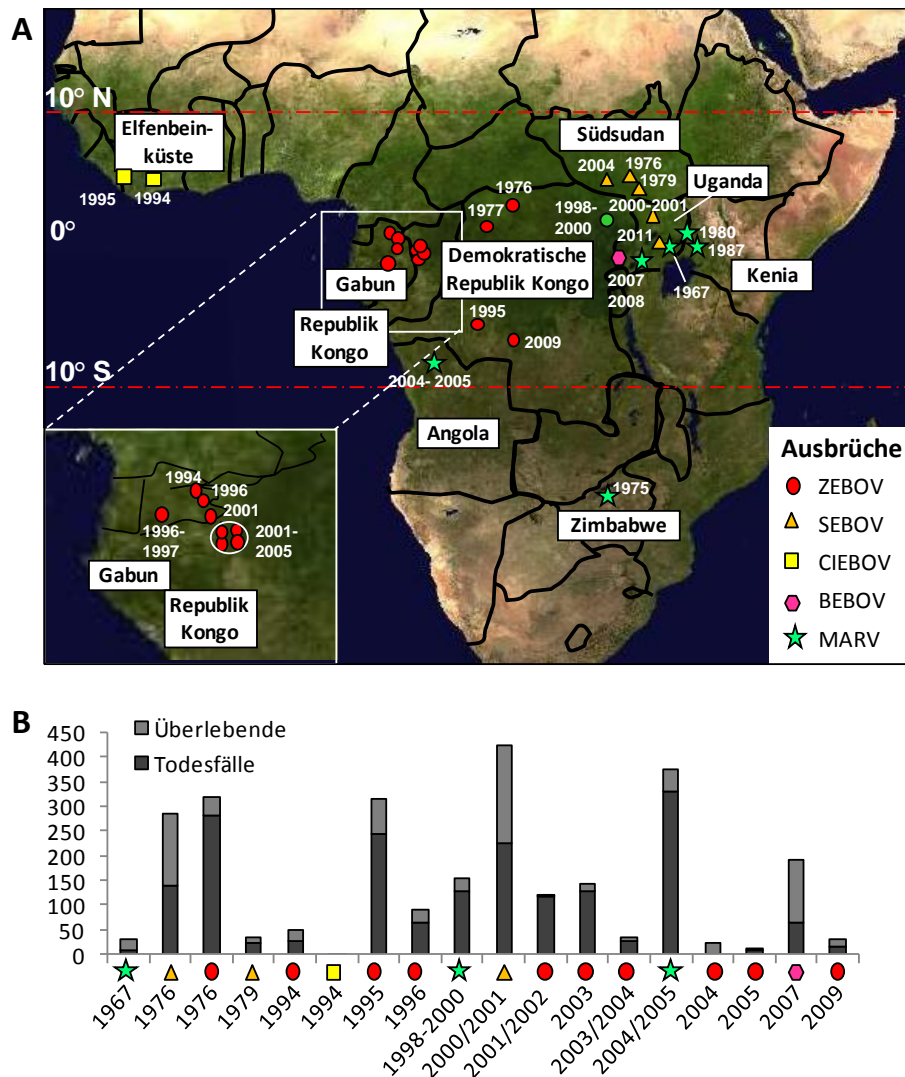
EBOV ist ebenfalls, mit Ausnahme von REBOV, endemisch in Afrika. Hier kam es 1976 nahezu zeitgleich zu Ausbrüchen im damaligen Zaire (heute: Demokratische Republik Kongo) und im Sudan (heute: Südsudan). Dabei wurde ein neues Virus isoliert, das nach einem im Endemiegebiet liegenden Fluss, Ebola, benannt wurde (27, 96, 164, 219, 220). Man klassifizierte das Virus in zwei Spezies: Zaire EBOV (ZEBOV) mit einer Letalitätsrate von 88 % und Sudan EBOV (SEBOV), das durch eine geringere Letalitätsrate von 55 % charakterisiert war (27, 128, 219, 220).

Im Jahr 1989 erkrankten in Reston (USA) von den Philippinen importierte *Cynomolgus*-Affen an einem schweren hämorrhagischen Fieber, dem eine neue EBOV-Spezies, das Reston EBOV (REBOV) zugewiesen wurde (91, 135). Das Virus ist apathogen für Menschen, allerdings konnte man kürzlich REBOV in Schweinepopulationen auf den Philippinen nachweisen (16, 88, 101, 135, 153). Damit unterscheidet sich REBOV von den anderen EBOV-Spezies, die Infektionen vor allem bei Menschen sowie Menschenaffen verursachen und die in Afrika endemisch sind (1, 70, 93, 165).

Ein weiterer Subtyp, das Côte d'Ivoire EBOV (CIEBOV), wurde 1992-1995 im Tai-Nationalpark (Elfenbeinküste) isoliert, nachdem Schimpansen an einem schweren hämorrhagischen Fieber erkrankten (58, 110). Bisher ist nur eine einzelne nicht-letale Humaninfektion bekannt, bei der es sich um eine Wissenschaftlerin handelt, die sich bei der Autopsie von infizierten Affen angesteckt hatte (59). Im Jahr 2007 kam es zu einem EBOV-Ausbruch mit 192 Infizierten und einer Letalitätsrate von 43 % im Distrikt Bundibugyo (Uganda), nach dem eine neue EBOV-Spezies benannt wurde: Bundibugyo EBOV (BEBOV) (121, 197, 207). Abbildung 2 zeigt das geographische Auftreten größerer Filovirus-Ausbrüche in Afrika, die sich auf ein Gebiet 10° nördlich und südlich des Äquators verteilen (sogenannter Ebola-Gürtel) sowie eine graphische Zusammenstellung der jeweiligen Fallzahlen erkrankter Personen (55, 155). Insgesamt beläuft



sich die Anzahl aller bisherigen EBOV-Infektionen auf 2317 humane Erkrankungen mit 1671 bestätigten Todesfällen (116). Zudem stellen EBOV-Infektionen in Gorillas und Schimpansen eine ernstzunehmende Bedrohung für deren Populationen dar (21, 34, 58, 99, 118).



**Abbildung 2: Epidemiologie von Filovirus-Infektionen. A. Geographisches Auftreten von Filovirus-Infektionen in Afrika.** Die verschiedenen Spezies sind farblich gekennzeichnet. B. Anzahl der Erkrankten und Todesfälle größerer Filovirus-Ausbrüche. Verändert nach (73, 83).

Die Frage nach dem Reservoir für Filoviren blieb lange Zeit ungeklärt (73, 112). Da Affen selbst eine klinisch fulminante Erkrankung entwickeln, scheiden sie als potenzieller Wirt aus, spielen jedoch als Überträger des Virus eine wichtige Rolle. Viele EBOV-Infektionen stehen in engem Zusammenhang mit dem Verspeisen von Buschfleisch infizierter Affen oder Flughunden (115, 148). Mittlerweile sind Flughunde (*Megachiroptera*) als Reservoir für Filoviren identifiziert worden (24, 115, 117, 195). Ihr Habitat entspricht dem geographischen Auftreten von

Filovirus-Infektionen, außerdem konnte man eine Koinzidenz humaner MARV-Infektionen mit vorangegangenen Aufenthalten in Höhlen feststellen, die von Fledermauspopulationen besiedelt sind (19, 115, 192, 194). Für EBOV wurden Flughunde der Gattung *Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti* und *Myonycteris torquata* als Reservoir identifiziert, MARV konnte in Fledermäusen der Gattung *Rousettus aegyptiacus* nachgewiesen werden (157, 185, 194, 195).

### 1.3 PATHOGENESE

Die Übertragung von Filoviren erfolgt überwiegend durch direkten Kontakt mit infizierten Körperflüssigkeiten (Blut, Speichel, Sperma, Faeces), wobei Haut- und Schleimhautläsionen eine Rolle spielen (181). Auch tragen das Verspeisen von kontaminiertem Fleisch erkrankter Tiere (*bush meat*) sowie traditionelle Beerdigungsriten zur Übertragung von Filoviren bei (115, 147).

Nach einer Inkubationszeit von zwei bis 21 Tagen kommt es zunächst zu Grippe-ähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen und Myalgien, die in Erbrechen, Diarrhoe sowie Pharyngitis übergehen können. Bei ca. 50 % aller Patienten entwickelt sich nach einigen Tagen ein makulopapulöses Exanthem. Fatale Verläufe gehen mit einer hohen Viruslast ( $>10^8$  Genomkopien/ml Blut) einher, die bereits zwei Tage nach Auftreten der Erkrankung erreicht wird (196). Das virale hämorrhagische Fieber manifestiert sich in Störungen der Blutgerinnung: Es treten Blutungen an Punktionsstellen sowie durch erhöhte Permeabilität der Endothelien verursachte Hämorrhagien im Gastrointestinalraum und an Schleimhäuten auf (15, 33, 57, 127, 184). Histopathologisch sind Organnekrosen zu beobachten, die in frühen Stadien der Erkrankung Lymphknoten, Milz und Leber betreffen und die sich auf Nieren und Lunge ausweiten (52, 154, 225). Bei einem fulminanten Verlauf führt die Infektion sechs bis 16 Tage nach Auftreten der ersten Symptome zum Tod durch Multiorganversagen und hypovolämischen Schock (9, 173).

Nach dem Eintritt in den Organismus infiziert das Virus zunächst Makrophagen, Monozyten und Dendritische Zellen, was eine schnelle Ausbreitung über die lymphatischen Organe im gesamten Organismus ermöglicht (167, 168, 176, 225, 226). Infizierte Monozyten und Makrophagen sezernieren verstärkt proinflammatorische Zytokine wie Interleukine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) (8, 113, 114, 211), die die Permeabilität des Endothels erhöhen und zu einer gestörten Blutgerinnung (Verbrauchskoagulopathie) führen (66). Im Gegensatz dazu sind infizierte Dendritische Zellen in der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine sowie in der Expression co-stimulatorischer Moleküle stark beeinträchtigt und können so ihre Aufgabe als T-Zell-Aktivatoren nicht erfüllen (25, 26, 122). Die adaptive Immunantwort wird durch die EBOV-Infektion unterdrückt. Es kommt zur massiven Apoptose von T-Zellen (sogenannte *Bystander-*

Lymphozyten) und Natürlichen Killerzellen, obwohl diese Zellen selbst nicht infiziert werden (9, 28, 67, 83, 173).

Eine spezifische antivirale Therapie gibt es bisher nicht; es erfolgt daher eine Symptom-orientierte intensivmedizinische Behandlung des hämorrhagischen Schocks und der Verbrauchskoagulopathie (81, 83). So konnte die Gabe eines Inhibitors des Gewebefaktors VIIa (rNAPc2) die Überlebensrate im Tiermodell auf 33 % erhöhen (66, 68). Eine passive Immunisierung mit Serum von rekonvaleszenten Patienten oder die Gabe von neutralisierenden Antikörpern zeigte bisher nur geringe Erfolge (83, 92, 140).

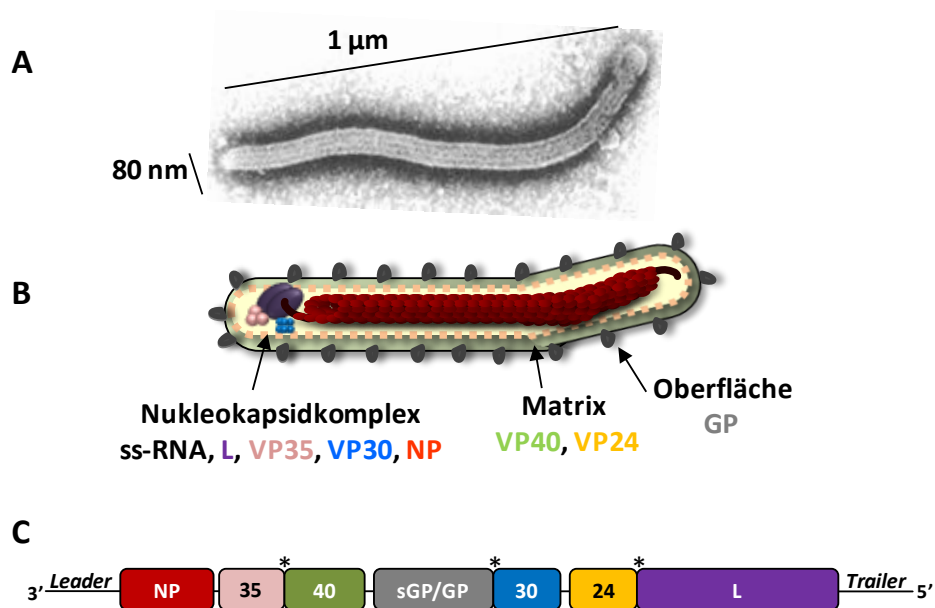
Hingegen gibt es vielversprechende Ansätze für eine Vakzinierung gegen EBOV, die sich vor allem auf rekombinante Gen-Expressionssysteme konzentrieren. So resultiert die Impfung mit replikationskompetenten Vesikulären Stomatitis Viren (VSV), in deren Hülle filovirale Glykoproteine inseriert wurden, in einem vollständigen Schutz in nichtmenschlichen Affen (53, 63-65, 97). Diese Vakzine fand bereits zur humanen post-expositionellen Therapie Verwendung, nachdem sich eine Labormitarbeiterin wahrscheinlich mit EBOV infiziert hatte (200). Ebenfalls aussichtsreich sind die Verabreichung von DNA-basierenden Vakzinen, rekombinanten Adenoviren, rekombinanten humanen Parainfluenzaviren oder die Verwendung von Virus-ähnlichen Partikeln (10, 32, 62, 158, 163, 182, 183, 186, 187, 208, 209).

#### **1.4 MORPHOLOGIE UND ZUSAMMENSETZUNG**

Filoviren besitzen eine charakteristische filamentöse Gestalt mit einem Durchmesser von etwa 80 nm und einer variablen Länge bis zu 1 µm (69). Ihr Erscheinungsbild ist pleomorph; häufig liegen sie jedoch in 6-förmiger oder langgestreckter Form vor. Abbildung 3 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBOV-Partikels (3A), dessen schematischen Aufbau (3B) sowie die Organisation des Virusgenoms (3C).

Filoviren besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom von 19 kb Länge, das in negativer Polarität (3'- 5') vorliegt und nicht segmentiert ist (48, 100, 161) (Abb. 3C). Die offenen Leserahmen für die sieben viralen Proteine sind von nichttranslatierten Regionen flankiert, die die Transkriptionsstart- und stoppsignale der jeweiligen Gene beinhalten (172). Am 3'- und 5'-Ende des viralen Genoms befinden sich nichttranslatierte *Leader*- und *Trailer*-Sequenzen, die den genomischen und antigenomischen Promotor sowie die Enkapsidierungs- und Verpackungssignale enthalten (141, 144). Zusammen mit der viralen RNA bilden vier Strukturproteine das helikale Nukleokapsid: das Nukleoprotein NP, die Polymerase L, ihr Co-Faktor VP35 und VP30 (48). Dieser Nukleokapsidkomplex repräsentiert die Transkriptions- und Replikationseinheit des Virus. NP als essentieller Faktor der viralen Transkription und Replikation enkapsidiert das virale Genom, das dadurch stabilisiert und vor zellulären Nukleasen geschützt wird. Außerdem ist NP durch die Interaktion mit dem Matrixprotein VP40

wichtig für den Zusammenbau (*Assembly*) und die Inkorporation der Nukleokapside in Viruspartikel (6, 119, 152, 210). Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase wird durch die katalytische Untereinheit L und dem Co-Faktor der Polymerase, VP35, gebildet (205). VP35 besitzt zudem eine essentielle Rolle als Interferon (IFN)-Antagonist, indem es die transkriptionelle Aktivierung von IFN-induzierten Genen unterdrückt (17, 18). Filoviren verfügen im Gegensatz zu anderen Vertretern innerhalb der Ordnung *Mononegavirales* über ein viertes Nukleokapsidprotein, VP30, das als essentieller Transkriptionsfaktor für EBOV agiert (139).



**Abbildung 3: Morphologie von EBOV. A. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBOV-Partikels in 8000-facher Vergrößerung.** Zur Verfügung gestellt von Dr. Larissa Kolesnikova. **B. Schematische Darstellung eines EBOV-Partikels.** **C. Genomstruktur von EBOV.** Die einzelsträngige RNA in negativer Orientierung kodiert für acht virale Proteine und ist flankiert von *Leader*- und *Trailer*-Sequenzen, die für Transkription, Replikation und Verpackung des Genoms essentielle Signale enthalten. Die offenen Leserahmen der jeweiligen Proteine überlappen an drei Positionen (\*).

Mit dem Nukleokapsidkomplex assoziiert ist das VP24, welches bisher den Matrixproteinen zugeordnet wurde (48, 84, 190). VP24 scheint für den Zusammenbau funktioneller Nukleokapside essentiell zu sein (75, 84, 119) und besitzt ebenfalls eine Rolle als Interferon-Antagonist, indem es die Expression IFN-induzierter Gene inhibiert (132, 162). Als klassisches Matrixprotein agiert VP40, indem es für Transport, *Assembly* und Abknospung (*Budding*) der Viruspartikel an der Wirtszellmembran verantwortlich ist (69, 79, 80, 94, 193). Außerdem spielen beide Matrixproteine eine Rolle bei der Regulierung der viralen Replikation (85). Als singuläres Oberflächenprotein ist das stark glykosylierte GP als Homotrimer in die Virusmembran integriert (56). Durch transkriptionelles Editing der GP mRNA gibt es drei verschiedene GP-Spezies: das lösliche sGP (*soluble* GP), welches von infizierten Zellen sezerniert wird und das vermutlich EBOV-spezifische Antikörper des Wirtes neutralisiert, eine

kleinere Form des sGP, das ssGP (*small soluble GP*), mit bisher unbekannter Funktion sowie das eigentliche Transmembranprotein GP (134, 174). GP vermittelt die Rezeptorbindung an Zielzellen und ist für den Eintritt des Virus in die Zelle und anschließende Fusion von Virusmembran mit Wirtszellmembran verantwortlich (12, 123, 124, 214).

### 1.5 VIRALER REPLIKATIONSZYKLUS

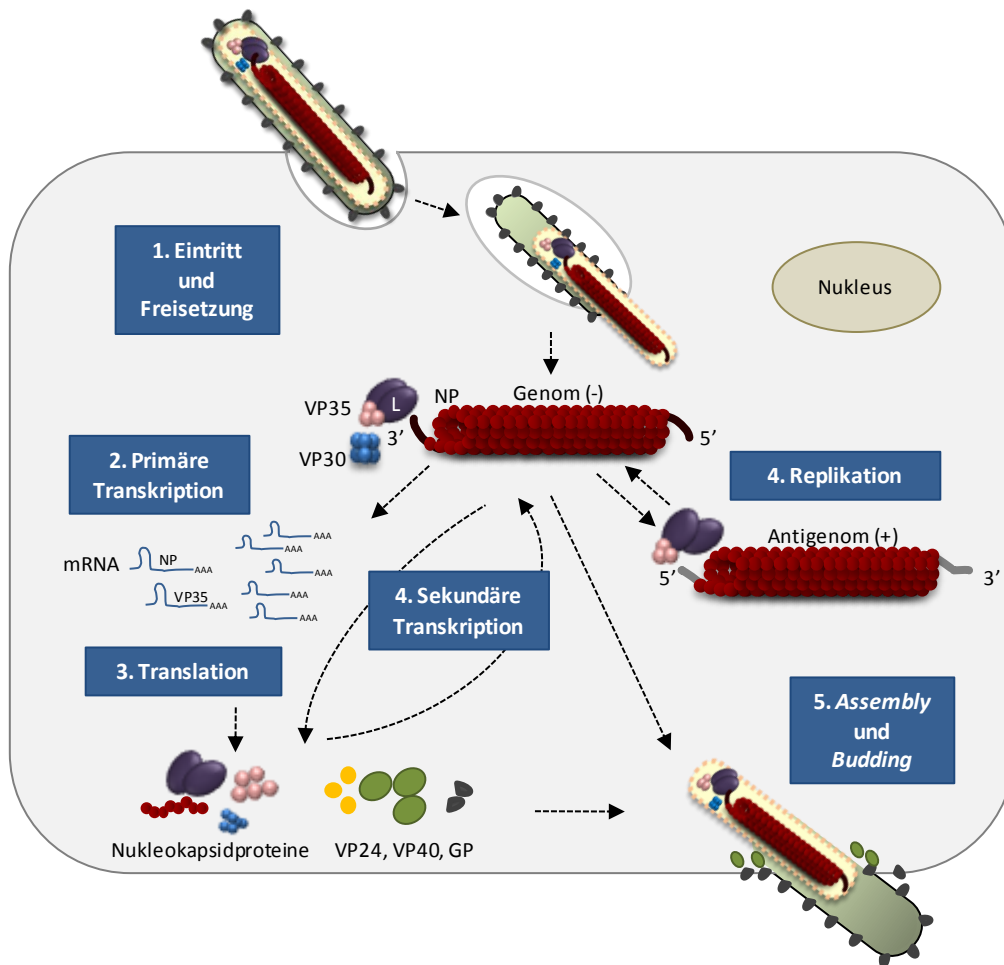
Der Replikationszyklus von EBOV lässt sich in folgende Phasen unterteilen (Abbildung 4): Rezeptorbindung und Eintritt des Virus in die Zelle [1], Primäre Transkription [2] mit folgender Translation der viralen Proteine [3], Replikation und Transkription ausgehend von neu synthetisierten Genomen (Sekundäre Transkription) [4] sowie Zusammenbau (*Assembly*) der Viruspartikel mit anschließender Freisetzung (*Budding*) [5]. EBOV besitzt einen breiten Wirtszelltropismus und verwendet daher wahrscheinlich unterschiedliche zelluläre Rezeptoren (221). So konnte TIM-1 (T-Zell Immunglobulin und Mucin Domäne-1) als ein Rezeptor für ZEBOV und MARV identifiziert werden (107). Dieser Rezeptor wird auf T-Zellen und mukosalen Epithelzellen exprimiert, jedoch nicht auf primären Zielzellen von Filoviren wie Dendritischen Zellen oder Makrophagen, was die Hypothese verschiedener filoviraler Rezeptortypen unterstützt. Eine weitere Rolle bei der Infektion von Zielzellen spielt die Oberflächenexpression von C-Typ Lektinen (DC-SIGN, DC-SIGNR, LSECtin), Folatrezeptor- $\alpha$ , Integrin  $\alpha 1$  und Axl: sie dienen wahrscheinlich der Adhärenz und Ankonzentrierung des Virus auf der Zelloberfläche (5, 30, 39, 71, 129, 130, 177-180, 188, 189, 202).

Der Aufnahmemechanismus von EBOV war lange Zeit nicht eindeutig geklärt. Nach Studien zur Clathrin-vermittelten Endozytose (22, 170) sowie zur Virusaufnahme über Caveolin und *lipid rafts* (Cholesterol-reiche Regionen in der Zellmembran) (20, 49, 224) weisen neuere Studien auf GP-vermittelte Makropinozytose als Mechanismus hin (4, 86, 145, 169).

Nach dem Eintritt des Virus in die Zelle erfolgt bei niedrigem pH und unter Beteiligung der Cathepsine B und L die Fusion von Virusmembran mit Endosomenmembran, was durch ein fusionsaktives GP vermittelt wird (40, 214, 215). Zudem konnte kürzlich mit Hilfe Genomumfassender Screens in humanen Zellen mit haploidem Chromosomensatz gezeigt werden, dass neben Komponenten des HOPS (*homotypic fusion and vacuole protein-sorting*) Komplexes, der für die Fusion von Endosomen und Lysosomen wichtig ist, insbesondere der Cholesterol Transporter Niemann-Pick C1 (NPC1) für die Fusion des GP mit der Endosomenmembran und damit für die Freisetzung der Nukleokapside eine essentielle Rolle spielt (37, 44). Nach Freisetzung der Nukleokapside ins Zytoplasma finden dort Transkription und Replikation des viralen Genoms statt (54, 89).

Filoviren besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom in negativer Orientierung (3'-5'), das heißt die RNA kann nicht direkt in Proteine translatiert werden, sondern muss zunächst in mRNA (5'-

3') synthetisiert werden (Primäre Transkription). Die dafür benötigten viralen Proteine NP, VP35, L und VP30 muss das Virus daher inkorporieren und in die neue Zelle einschleusen.



**Abbildung 4: Vermehrungszyklus von EBOV.** Nach Bindung an den Rezeptor erfolgt die Endozytose des Viruspartikels in die Zelle. Die GP-vermittelte Fusion von Virusmembran mit Endosomenmembran resultiert in der Freisetzung des helikalen Nukleokapsids ins Zytoplasma [1]. Mit Hilfe der inkorporierten Nukleokapsidproteine NP, VP35, L und VP30 erfolgt die primäre Transkription des viralen Genoms in mRNA [2], die anschließend durch die zelluläre Translationsmaschinerie in die jeweiligen viralen Proteine übersetzt wird [3]. Durch einen bisher unbekannten Mechanismus kommt es zum Wechsel von Transkription zu Replikation. NP, VP35 und L replizieren ein positivsträngiges Antigenom, das als Matrize für die Replikation der genomischen RNA verwendet wird [4]. Die genomische RNA dient wiederum als Template zur Synthese neuer viraler Proteine (Sekundäre Transkription) oder lagert sich mit den neusynthetisierten Nukleokapsid- sowie den restlichen viralen Proteinen zusammen, wird in neue Viruspartikel verpackt und ausgeschleust [5. *Assembly und Budding*]. Bild in Anlehnung an (29).

VP35 interagiert sowohl mit NP als auch mit L und kann so die Polymerase an die von NP enkapsidierte RNA rekrutieren (133, 144, 149, 150). Als virusspezifischer Transkriptionsfaktor fungiert VP30, welches für die Transkriptionsinitiation essentiell ist (78, 128, 139). Die Transkriptionsinitiation am ersten Gen ist aufgrund einer RNA-Sekundärstruktur VP30-abhängig; vermutlich ermöglicht VP30 dem Polymerasekomplex diese Barriere zu überwinden. Ist diese Struktur zerstört, wird VP30 für die Transkriptionsinitiation des ersten Gens nicht benötigt (213). Neue Studien mit rekombinanten EBOV konnten zudem zeigen, dass VP30 auch für die Transkriptionsreinitiation nachfolgender Gene essentiell ist (128).

Ein wahrscheinlich einziger Transkriptionspromotor am 3'-Ende ermöglicht dem Polymerasekomplex die viralen Gene in 3'-5'-Richtung sukzessive in einem Start-Stopp-Mechanismus abzulesen und damit mRNAs zu synthetisieren. Dies geschieht unter Verwendung der Transkriptionsstart- und stoppsignale, die an den jeweiligen Gengrenzen positioniert sind. Dazwischen befinden sich nichttranskribierte intergenische Regionen, die in ihrer Länge stark variieren und die womöglich eine regulierende Rolle bei der Transkriptionsreinitiation spielen (29). Der Polymerasekomplex ist an den intergenischen Regionen vermutlich schwächer mit der RNA-Matrize assoziiert und löst sich dadurch wieder leichter. Anschließend kann eine erneute mRNA-Synthese nur wieder am 3'-Ende liegenden Transkriptionspromotor initiiert werden. Die 3'-proximalen Gene werden demnach deutlich häufiger abgelesen als näher am 5'-Ende gelegene Gene, so dass ein Gradient an mRNAs entsteht (141, 156, 218). Die viralen mRNAs sind monocistronisch, werden nicht enkapsidiert und weisen an ihrem 5'-Ende eine Sekundärstruktur auf, deren Funktion unklar ist (143, 171, 172). Außerdem besitzen sie eine 5'-Cap Struktur und sind an ihrem 3'-Ende polyadenyliert (40, 141, 171). Diese Modifikationen erfolgen co-transkriptional durch die Polymerase L in Analogie zu anderen Viren innerhalb der Ordnung *Mononegavirales*. Die Polyadenylierung am 3'-Ende der mRNA entsteht durch ein „Stottern“ der Polymerase, indem sie Uridine im Transkriptionsstoppsignal mehrfach abliest und resultiert in ca. 100-300 angehängten Adenosinresten (29, 217, 218). Die mRNA des GP-Gens unterliegt einem ähnlichen Mechanismus. Das Primärprodukt der GP-mRNA kodiert für einen Vorläufer des sGP, pre-sGP. Bei 20 % aller mRNAs findet ein *Editing*-Prozess statt, bei der ein zusätzlicher 8. Adenosinrest eingefügt wird. Das inserierte Nukleotid bewirkt eine Leserasterverschiebung, die in der Synthese des eigentlichen Volllänge-GPs endet (174). Vermutlich dient diese Limitierung der Produktion von Volllänge-GP dazu, die Zytotoxizität durch GP zu reduzieren (206, 223).

Die Translation aller viralen Proteine bis auf GP erfolgt im Zytoplasma an freien Ribosomen durch die zelluläre Translationsmaschinerie. GP wird am rauen Endoplasmatischen Reticulum (rER) synthetisiert und gelangt entlang des sekretorischen Transportwegs an die Zelloberfläche (79, 104, 106). Dabei erfährt es zahlreiche posttranslationale Modifizierungen wie O- und N-Glykosylierungen sowie Acylierung und wird im Trans-Golgi-Netzwerk in GP<sub>1,2</sub> gespalten (61, 90, 204). Der Mechanismus, der bei EBOV den Übergang von Primärer Transkription zu Replikation und Sekundärer Transkription reguliert, ist bisher unbekannt. Bei Rhabdoviren geht man u.a. davon aus, dass die Menge an synthetisiertem NP eine Rolle spielt. Zur Synthese der enkapsidierten RNA müssen wahrscheinlich NP-Moleküle von der Matrize dissoziieren, um dem Polymerasekomplex einen direkten Kontakt zur RNA zu ermöglichen. In frühen Phasen der Infektion sind nur wenige NP-Moleküle vorhanden, die leichter von der RNA-Matrize

verdrängt werden können. Nach der Synthese einer zur *Leader*-Sequenz komplementären RNA ist daher das erste Transkriptionsstartsignal für den Polymerasekomplex besser zugänglich und es kommt nach Freisetzung der *Leader*-RNA zur Synthese viraler mRNAs. Sind in späteren Phasen der Infektion ausreichende Mengen an NP vorhanden, wird die *Leader*-RNA direkt enkapsidiert, so dass die Transkriptionsstartsignale überlesen werden und es zur Synthese eines vollständig durch NP enkapsidierten Antigenoms kommt (43, 102). Andere Gruppen postulieren den Polymerasekomplex in zwei unterschiedlichen Formen: als Transkriptase- und Replikasekomplex. Die Transkriptase initiiert die Synthese der mRNAs demnach direkt am ersten Genstartsignal, während die Replikase an ihrem Promotor am 3'-Ende beginnt (11, 160, 217). Bei EBOV ist die Replikation im Gegensatz zur Transkription von VP30 unabhängig, was die Hypothese zweier unterschiedlicher Polymerasekomplexe unterstützen würde. Bei der Replikation werden zwei verschiedene Matrizen repliziert: Zunächst erfolgt die Synthese eines vollständigen Antigenoms (positive Orientierung 5'-3'), das ebenfalls von NP enkapsidiert wird (141). Ausgehend vom Antigenom wird ein negativsträngiges Virusgenom (3'-5'-Orientierung) repliziert. Dieses dient wiederum als Template zur Transkription der viralen Proteine (Sekundäre Transkription) oder wird in neue Virionen verpackt. Das Genom besitzt daher am 3'-Ende Promotoren für sowohl Transkriptions- als auch Replikationssignale, die miteinander überlappen. Der Replikationspromotor besteht aus zwei Elementen: Promotorelement 1 (PE1), das sich im *Leader*-Bereich befindet sowie Promotorelement 2 (PE2), das bis in die 3'-nichttranslatierte Region (NTR) des ersten Gens reicht. Zwischen beiden PEs befindet sich eine *Spacer*-Region, die das Transkriptionsstartsignal für NP enthält und aus einer Abfolge von UN<sub>5</sub>-Hexameren besteht (50, 85, 141, 212). Verkürzungen oder Verlängerungen in dieser Region sind tolerierbar, solange sie ein Vielfaches von sechs sind (212). Die *Spacer*-Region unterliegt somit der sogenannten *rule-of-six*, wie sie bei Pneumoviren mit zweigeteilten Replikationspromotoren vorkommt, allerdings bezieht sich die *rule-of-six* dort auf die Gesamtgenomlänge und nicht ausschließlich auf die Promotorregion (35, 36, 218).

Sind ausreichend virale Strukturproteine synthetisiert worden, akkumulieren sie in der Zelle perinukleär in sogenannten Einschlusskörpern (*inclusion bodies*), die wahrscheinlich den Ort von Virustranskription, -replikation und -*assembly* repräsentieren: NP, VP35, VP30, L und VP24 lagern sich zusammen und bilden mit dem replizierten RNA-Genom neue Nukleokapsidkomplexe aus (69, 79, 106, 149, 190, 210).

Die Rolle des Zytoskeletts für den Transport der fertigen Nukleokapside zum Ort der Virusfreisetzung ist bei EBOV bisher nicht eindeutig geklärt. Vermutlich spielen Mikrotubuli eine Rolle (166). Die Interaktion des NP C-Terminus mit VP40 vermittelt vermutlich die Inkorporation der Nukleokapside in knospende Viruspartikel (152). Die Freisetzung (*Budding*)



von Viruspartikeln an der Plasmamembran wird hauptsächlich durch VP40 induziert und findet an filamentösen zellulären Ausstülpungen statt, die bei MARV Charakteristika von Filopodien aufweisen (105, 151, 216). Bei MARV erfolgt der Transport des VP40 zum Ort des *Buddings* über den retrograden späten endosomalen Weg und *multivesicular bodies* (MVBs) (94, 103, 104). GP co-lokalisiert nach prozessiver Spaltung in GP<sub>1,2</sub> im Trans-Golgi-Netzwerk ebenfalls in MVBs (103, 104, 136, 151). Prolin-reiche Motive innerhalb des VP40, sogenannte *late domains*, rekrutieren zelluläre Proteine wie Nedd4, Alix oder Tsg101 und können so mit der endosomalen Sortierungsmaschinerie (*endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT) interagieren und die Abschnürung neuer viraler Partikel bewirken (80, 120, 125, 201). Für einen kompletten Replikationszyklus benötigt EBOV in VeroE6-Zellen ca. 16 h.

## 1.6 REVERSE GENETIK VON EBOLAVIREN

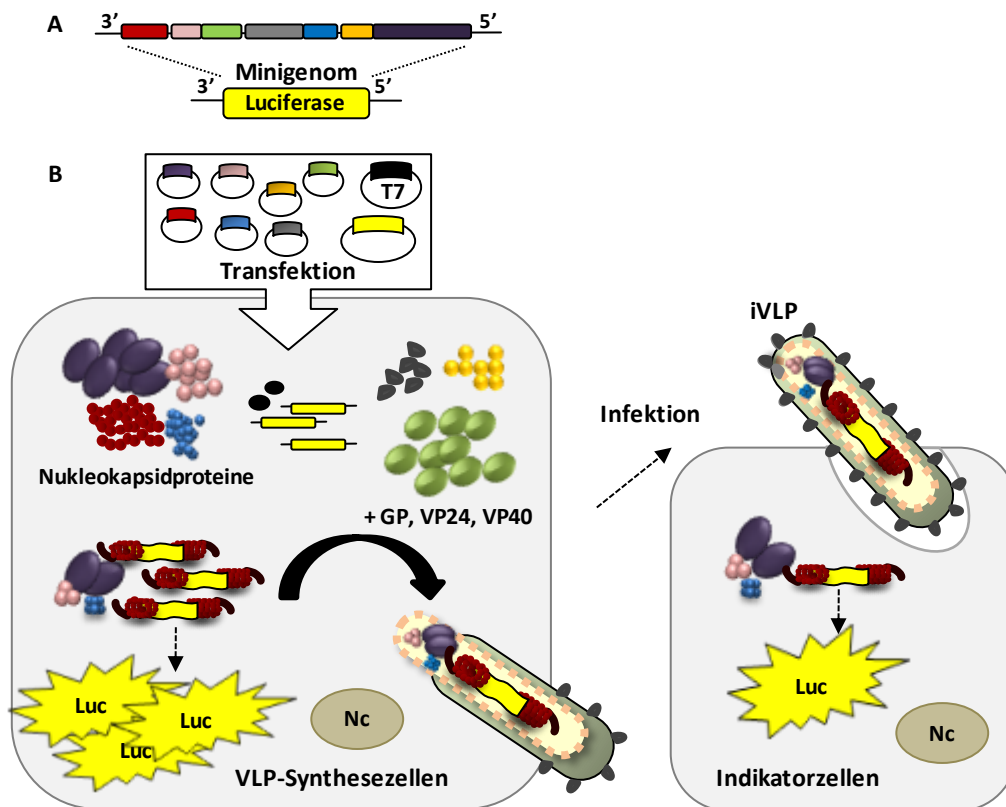
Der Terminus Reverse Genetik definiert das Einfügen von Mutationen in das Genom und die anschließende Charakterisierung des dadurch hervorgerufenen Phänotyps. Damit steht die Reverse Genetik im Gegensatz zur klassischen Genetik (Auftreten eines bestimmten Phänotyps und nachfolgende Analyse von Mutationen im Genom). Im hier beschriebenen viralen Kontext können mittels Reverser Genetik rekombinant mutierte Viren hergestellt und deren Lebenszyklus untersucht werden (Rescue) (191). Außerdem erlaubt die Verwendung von modifizierten Reversen Genetik Systemen wie dem infektiösen *virus-like particle* (iVLP) Assay, Untersuchungen zum Einfluss bestimmter Mutationen auf verschiedene Bereiche des Replikationszyklus unter BSL1-Bedingungen.

### 1.6.1 EBOLAVIRUS-SPEZIFISCHER INFEKTIÖSER VIRUS-LIKE PARTICLE (iVLP)-ASSAY

Der infektiöse *virus-like particle* (iVLP)-Assay erlaubt Untersuchungen zur viralen Transkription unter BSL1-Bedingungen, das heißt Arbeiten mit hochpathogenem EBOV unter BSL4-Bedingungen können unter bestimmten Fragestellungen vermieden werden (82, 84). Der Assay basiert auf einem Minigenomsystem, bei dem die offenen Leserahmen aller viralen Proteine durch ein Reporterger (hier Renilla-Luciferase) ersetzt werden (Abb. 5A).

Das Reporterger wird flankiert von den 3'-*Leader* und 5'-*Trailer*-Sequenzen des viralen Genoms, die die für virale Transkription und Replikation essentiellen Erkennungssignale enthalten. Das Minigenom steht unter der Kontrolle eines T7-Promotors, der nach zusätzlicher Expression der T7-Polymerase die Synthese einer für den viralen Polymerasekomplex verwendbaren negativsträngigen RNA steuert. Am 3'-Ende des Minigenoms ist eine Ribozymsequenz des Hepatitis Delta Virus eingefügt, die definierte 3'-Enden und damit eine authentische *Leader*-RNA gewährleistet. Alle viralen Proteine sowie das Minigenom werden in Zellen rekombinant exprimiert (VLP-Synthesezellen). Die Transkription findet nun analog zu

einer Virusinfektion statt: nachdem das Minigenom durch die T7-Polymerase in RNA umgeschrieben wurde, wird diese von NP, L, VP35 und VP30 transkribiert und anschließend zellulär translatiert. Gleichzeitig wird das Minigenom als Matrize zur Replikation verwendet, da alle viralen Proteine bedingt durch die zelluläre Expression bereits in ausreichenden Mengen vorhanden sind.



**Abbildung 5: Infektiöser virus-like particle (iVLP)-Assay. A. EBOV-spezifisches Minigenom.** Die offenen Leserahmen der einzelnen viralen Proteine sind durch ein Luciferase-Reportergen (Luc) ersetzt, das von den 3'-Leader und 5'-Trailer Sequenzen des viralen Genoms flankiert wird. Das Gen steht unter Kontrolle eines T7-Promotors, der nach rekombinanter Expression der T7-Polymerase die Synthese einer einzelsträngigen RNA ermöglicht. **B. iVLP-Assay.** Die rekombinante Expression aller viralen Proteine sowie der T7-Polymerase und dem EBOV-spezifischen Minigenom resultiert in der Transkription des Reportergens durch die Nukleokapsidproteine. Nach Translation des Reportergens durch zelluläre Proteine wird dessen enzymatische Aktivität ermittelt, was ein Maß für die virale Transkription und Replikation darstellt. Gleichzeitig wird das Minigenom durch den Polymerasekomplex repliziert, enkapsidiert und zusammen mit VP24, VP40 und GP in neue iVLPs verpackt und ausgeschleust. Die iVLPs werden anschließend zur Infektion neuer Zellen verwendet (Indikatorzellen), in denen die Primäre Transkription des Minigenoms durch die inkorporierten Nukleokapsidproteine mittels Reporter-Assays ermittelt wird. Nc=Nukleus.

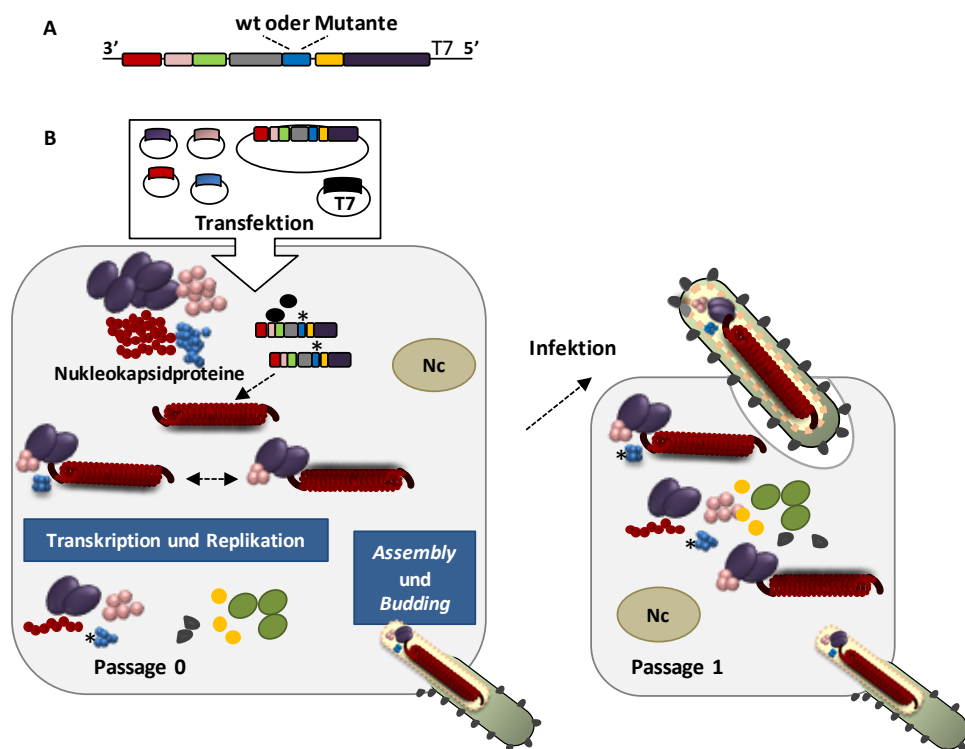
Diese Konditionen reflektieren späte Stadien im Infektionszyklus, da hier direkt Sekundäre Transkription und Replikation parallel stattfinden können. Die Aktivität des Reportergens wird durch die enzymatische Aktivität des translatierten Reporterproteins Luciferase ermittelt (Luciferase-Assay) und dient als Maß für die virale Transkription. Die Transkription wird durch die Replikation des Minigenoms und der damit einhergehenden erhöhten Verfügbarkeit von Matrizen für beide Prozesse potenziert (85). Das replizierte Minigenom wird durch NP

enkapsidiert und analog zum Vermehrungszyklus von EBOV in Virus-ähnliche Partikel verpackt und freigesetzt (Abb. 4). Dabei unterscheiden sich die iVLPs vom *wildtypischen* Virus ausschließlich durch das inkorporierte Genom.

Die freigesetzten iVLPs werden zur Infektion neuer Zellen verwendet (Indikatorzellen) und durchlaufen dabei die essentiellen Schritte einer authentischen EBOV-Infektion: Aufnahme der iVLPs in die Zelle, Freisetzung der Nukleokapside ins Zytoplasma und Primäre Transkription durch die inkorporierten viralen Nukleokapsidproteine. Dabei kommt es zur erneuten Synthese des Reporterproteins, welches wiederum mittels enzymatischen Assays nachgewiesen werden kann. Die Enzymaktivität repräsentiert unter diesen Bedingungen ein Maß für die primäre virale Transkription. Sekundäre Transkription und Replikation finden in den Indikatorzellen nicht mehr statt, da die offenen Leserahmen für die viralen Proteine durch das Reportergen ersetzt worden sind und so die erneute Synthese aller viralen Proteine unterbunden ist.

### 1.6.2 GENERIERUNG VON REKOMBINANTEM EBOLAVIRUS

Die Reverse Genetik ermöglicht die Herstellung von rekombinanten EBOV mit genomischen Mutationen, die in der Expression mutierter viraler Proteine in einem authentischen Viruskontext resultiert.



**Abbildung 6: Generierung von rekombinantem EBOV.** A. EBOV-spezifisches Volllängeplasmid. Das Volllängeplasmid enthält das gesamte virale Genom und steht unter Kontrolle eines T7-Promotors, der nach rekombinanter Expression der T7-Polymerase die Synthese einer einzelsträngigen RNA ermöglicht. In das Volllängeplasmid können Mutationen (\*) eingefügt werden. B. Rescue von rekombinantem EBOV. Die rekombinante Expression der Nukleokapsidproteine sowie der T7-Polymerase und dem EBOV-spezifischen Volllängeplasmid resultiert in der Transkription des Virusgenoms in mRNA. Dadurch kommt es zur Synthese aller im Virusgenom kodierten Proteine und es findet nach Replikation, Assembly und Budding die Freisetzung neuer rekombinant hergestellter Viruspartikel statt. Diese können neue Zellen (Passage 1) infizieren und durchlaufen dort den Infektionszyklus authentischer Viren. Nc = Nukleus.

Die Grundlage bildet ein cDNA-Volllängeplasmid, welches die in DNA überschriebene Information des gesamten viralen Genoms beinhaltet und das mit Hilfe molekularbiologischer Methoden einfach mutagenisiert werden kann (Abb. 6A). Das Volllängeplasmid steht unter der Kontrolle eines T7-Promotors, der nach zusätzlicher Expression der T7-Polymerase die Synthese eines einzelsträngigen RNA-Transkripts ermöglicht. Die ebenfalls rekombinant exprimierten Nukleokapsidproteine verpacken und transkribieren die entstandene vRNA, so dass alle viralen Proteine synthetisiert werden und der Replikationszyklus ablaufen kann (Abb. 6B). Die generierten rekombinanten Viren können nun wiederum neue Zellen infizieren und folgen demnach dem Infektionszyklus authentischer Viren (146, 191).

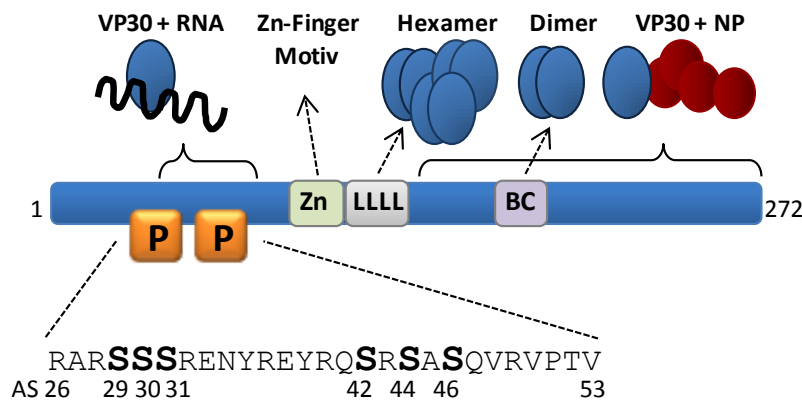
### 1.7 VP30 ALS EBOV-SPEZIFISCHER TRANSKRIPTIONSFAKTOR

EBOV VP30 stellt eine Besonderheit innerhalb der Ordnung *Mononegavirales* dar: als zusätzliches viertes Nukleokapsidprotein ist es zusammen mit dem Polymerasekomplex L und VP35 sowie NP ein essentieller Faktor der viralen Transkription. Hingegen wird VP30 für die Replikation des Virusgenoms nicht benötigt (144). Es ist also vorstellbar, dass EBOV zwei verschiedene Polymerasekomplexe besitzt, die bei Rhabdoviren bereits beschrieben wurden (217, 218): Einen Transkriptasekomplex bestehend aus NP, VP35, L und VP30 sowie einen Replikasekomplex, der sich aus NP, VP35 und L zusammensetzt.

Die Aktivität des VP30 als Transkriptionsfaktor ist reguliert über die Phosphorylierung von sechs N-terminal gelegenen Serinresten, die sich in zwei Cluster von jeweils drei Serinen zusammenfassen lassen. Die Phosphorylierung der Serine deaktiviert das VP30, wodurch die Transkription zum Erliegen kommt. Ist VP30 nicht phosphoryliert, unterstützt es die virale Transkription (139). Allerdings spielt die Dynamik zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung hierbei eine wichtige Rolle. Die Blockade zellulärer VP30-spezifischer Phosphatasen führte zu einer starken Phosphorylierung des VP30 und gleichzeitig zu einem Stopp der viralen Transkription. Dieser Befund legte nahe, dass nicht nur die Phosphorylierung, sondern auch die Dephosphorylierung des VP30 für die Transkription von Bedeutung ist (139). Über die an diesen Prozessen beteiligte Kinase ist bisher nichts bekannt. In eigenen Arbeiten konnte ferner gezeigt werden, dass ausschließlich VP30 mit phosphorylierbaren Serinresten in der Lage ist, die Primäre Transkription zu initiieren. Nichtphosphorylierbares VP30, welches durch Substitution der Serinreste durch Alanin imitiert wurde, kann die Primäre Transkription nicht aktivieren; unterstützt aber die virale Transkription in späten Stadien einer Infektion, wenn die Verfügbarkeit der viralen Proteine nicht limitiert ist (23, 128).

Die Abhängigkeit der viralen Transkription von VP30 wird unter anderem durch eine Sekundärstruktur im Bereich des ersten Gens bestimmt, die vermutlich auf mRNA-Ebene gebildet wird. Wird die Ausbildung der Sekundärstruktur zerstört, findet die virale

Transkription auch ohne die Anwesenheit von VP30 statt (213). VP30 unterstützt womöglich den Polymerasekomplex dabei, diese Struktur zu überwinden. In neueren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass auch die Reinitiation der Transkription nachfolgender Gene von einem funktionellen VP30 abhängig ist (128).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des EBOV VP30.** Bisher identifizierte Funktionsdomänen des VP30 sind schematisch dargestellt. P=Phosphorylierung, Zn=Zink, L=Leucin, BC=Basisches Cluster, AS=Aminosäure. Die Aminosäuresequenz 26-53 beinhaltet die phosphorylierbaren Serinreste (fett gedruckt), die sich in zwei Clustern mit jeweils drei Serinresten gliedern.

Im Bereich der Phosphorylierungsstellen findet sich auch die Bindungsdomäne für die Interaktion des VP30 mit RNA (AS 26-40), die durch eine Arginin-reiche Region charakterisiert ist (Abb. 7). Dabei wurde AS Arginin 40 als besonders wichtig für die Bindung von VP30 an EBOV-spezifische *Leader*-RNA identifiziert (95). Als charakteristisches Merkmal eines RNA-bindenden Proteins ist im Bereich AS 68-95 zudem ein unkonventionelles Zinkfinger-Motiv lokalisiert, dessen Integrität für die Funktion von VP30 als Transkriptionsaktivator essentiell ist (31, 95, 138). Zudem verbessert die Anwesenheit von Zink-Ionen die Bindung des VP30 an RNA (95).

Analysen, die durch die Auflösung der räumlichen Struktur des VP30 C-Terminus ermöglicht wurde, ergaben, dass VP30 über ein basisches Clusters im C-Terminus (AS 179-183) dimerisiert und diese Dimere über ein Tetra-Leucin Motiv (AS 94-112) im N-Terminus zu Hexameren oligomerisieren (76-78). Die virale Transkription wird nur durch hexameres VP30 induziert, während VP30-Dimere oder -Monomere inaktiv sind.

## 1.8 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Als EBOV-spezifischer essentieller Transkriptionsfaktor wird VP30 über die Phosphorylierung an zwei N-Terminal gelegenen Serinclustern reguliert. Es ist aber nach wie vor ungeklärt, wie genau die Phosphorylierung die Aktivität des Proteins modifiziert.

Während VP30 für die Aktivierung der viralen Transkription zusammen mit den Nukleokapsidproteinen NP, VP35 und der Polymerase L eine entscheidende Rolle spielt, ist die Replikation des viralen Genoms von VP30 unabhängig. Durch welchen Mechanismus der Übergang von Transkription zu Replikation induziert wird, ist bisher unbekannt. Möglicherweise agieren zwei unterschiedliche Polymerasekomplexe: ein Transkriptasekomplex (NP, VP35, L, VP30) und ein Replikasekomplex (NP, VP35, L), die sich durch die Aktivität des VP30 unterscheiden. Es sollte daher untersucht werden, inwiefern die Phosphorylierung des VP30 zum Übergang von viraler Transkription zu Replikation beiträgt: Besitzt die Phosphorylierung des VP30 einen direkten Einfluss auf die Replikation oder reguliert sie möglicherweise die Interaktion mit den Nukleokapsidproteinen und spielt damit eine Rolle für die Zusammensetzung des Polymerasekomplexes.

Aus vorangegangenen Arbeiten ging hervor, dass zu frühen Zeitpunkten des EBOV Infektionszyklus eine dynamische Phosphorylierung der VP30 Serincluster benötigt wird, um die Primäre Transkription zu aktivieren. In diesem Zusammenhang sollte die Signifikanz einzelner Serinreste für die Primäre Transkription genauer charakterisiert werden. Zunächst sollten diese Untersuchungen in artifiziellen Systemen durchgeführt werden, um im Anschluss daran zu analysieren, inwieweit die Phosphorylierung einzelner Serinreste für die Generierung von rekombinanten EBOV von Bedeutung ist.

Weiterhin beeinflusst die Phosphorylierung die zelluläre Lokalisation des VP30 nach rekombinanter Expression: so konzentriert sich phosphoryliertes VP30 (imitiert durch die Mutante VP30\_DD) in zellulären Einschlusskörpern, die vermutlich den Ort von viraler Transkription, Replikation und *Virusassembly* darstellen, während ein VP30, dessen Phosphorylierungsstelle permanent ungeladen ist (VP30\_AA), diffus im Zytoplasma verteilt ist. Mit Hilfe eines neu generierten phosphospezifischen VP30 Peptidantikörpers sollte die zelluläre Verteilung des phosphorylierten bzw. dephosphorylierten VP30 im Rahmen einer Infektion mit neu hergestellten rekombinanten Viren charakterisiert werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 CHEMIKALIEN

#### Agarose PeqGold universal

Alcyan Blue

Ammoniumpersulfat (APS)

Ampicillin (Natriumsalz)

#### Bacto™-Agar

Bovines Serumalbumin (BSA)

Bromphenolblau (BPB)

#### Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O)

Carboxymethylcellulose (CMC)

Caseinhydrolysat

Cell Extraction Buffer (CEB)

Chloroform

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets

#### D(+)- Glucose

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

1,4 Diazabicyclo-[2.2.2]-octan (DABCO)

Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Dinatriummethylendiamintetraacetat (EDTA)

#### Essigsäure (HAc)

Ethanol abs. (EtOH)

Ethanol vergällt (EtOH)

Ethidiumbromid

#### Fluoprep

Formvar

Glycerin

Glycin

#### Hefeextrakt

#### Isopropanol

#### Kaliumchlorid (KCl)

Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Kanamycin

#### L-Glutamin 200 mM

#### Magermilchpulver

Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O)

Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O)

6x MassRuler™ DNA Loading Dye

β-Mercaptoethanol

#### Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)

Natriumchlorid (NaCl)

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Natriumhydroxid (NaOH)

Peqlab, Erlangen (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Biorad, Hercules (USA)

Serva, Heidelberg (D)

Becto, Dickinson & Company, Sparks (USA)

Sigma-Aldrich, München (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Merck, Darmstadt (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Merck, Darmstadt (D)

Invitrogen, Karlsruhe (D)

Acros Organics, Geel (B)

Roche Diagnostics, Indianapolis (USA)

Merck, Darmstadt (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Merck, Darmstadt (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Merck, Darmstadt (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Fischar, Saarbrücken (D)

Promega, Mannheim (D)

BioMérieux, Nürtingen (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Merck, Darmstadt (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Merck, Darmstadt (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)

Saliter, Obergünzburg (D)

Merck, Darmstadt (D)

Merck, Darmstadt (D)

Fermentas, St.Leon-Rot (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Merck, Darmstadt (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Merck, Darmstadt (D)

Riedel-de-Haën, Seelze (D)

N(onidet)P40	Merck, Darmstadt (D)
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b>	Roth, Karlsruhe (D)
Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Pepton	Merck, Darmstadt (D)
Phosphorwolframsäure	Serva, Heidelberg (D)
PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics, Indianapolis (USA)
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, München (D)
<b>RiboLock RNase Inhibitor (400 U/μl)</b>	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Rotiphorese® Gel 30 (Polyacrylamid)	Roth, Karlsruhe (D)
<b>Salzsäure (HCl)</b>	Merck, Darmstadt (D)
Stickstoff (99,996 %)	Messer-Griesheim, Siegen (D)
Sucrose	Serva, Heidelberg (D)
<b>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)</b>	Biorad, Hercules (USA)
TransIT® LT1 Transfection Reagent	Mirus Bio, Madison (USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros Organics, Geel (B)
TritonX- 100	Sigma-Aldrich, München (D)
Tween® 20	neoLab®, Heidelberg (D)

## 2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

6, 24, 96 well Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
96 well Platten <i>LumiNunc™</i> , schwarz oder weiß	Nunc, Roskilde (DK)
2 ml Kryoröhrchen mit Dichtung	Corning®, Acton (USA)
Blottingpapier <i>GB 002</i> (Whatman® 3 mm)	Whatman, Maidstone (UK)
Cellulosenitratfolie <i>PROTRAN®</i> , Ø 0,45 μm	Whatman, Maidstone (UK)
Deckgläser, Ø 12 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Gewebekulturröhrchen (TC-Tube)	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Indikatorpapier	Merck, Darmstadt (D)
Mikroschraub Röhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht (D)
MicroAmp® Optical 8-Tube und Cap Strips, 0,2 ml	Applied Biosystems, Cheshire (UK)
Objektträger 76 x 22 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Parafilm	Pechiney Plastic, Menasha (USA)
PCR-Tubes, 0.2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf (D)
Petrischalen	Sarstedt, Nürnbrecht (D)
Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml <i>Cellstar®</i>	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Pipettenspitzen 0.1-1μl, 10-100μl, 100-1000μl	Starlab, Ahrensburg (D)
<i>TipOne®</i> (gefiltert und ungefiltert)	
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml / 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbrecht (D)
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Skalpell no.22 Feather	Feather, Osaka (J)
Sterilfilter Ø 0,2 μm	Schleicher & Schuell, Maidstone (UK)
Zellschaber	Sarstedt, Nürnbrecht (D)
Zentrifugenröhrchen, <i>Ultraclear™</i>	Beckmann, Palo Alto (USA)
für SW41, SW60, SW32	



## 2.3 KITS

Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega GmbH, Mannheim
HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden (D)
PageSilver™ Silverstaining Kit	Fermentas, St.Leon Rot (D)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen (D)
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden (D)
QuikChange™ Multi Site Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn (D)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden (D)
Taq DNA Polymerase Kit	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
Titan™ One Tube RT-PCR Kit	Roche, Mannheim (D)
Two Step RT und RealTime PCR™ Kit	PeqLab, Erlangen (D)
Z-Competent <i>E.coli</i> Transformation Kit™ and Buffer Set	Zymo Research, Orange (USA)

## 2.4 GERÄTE

Brutschrank <i>HERAcell150</i> , <i>HERAcell240</i>	Thermo Fisher, Hudson (USA)
DNA-Gelkammern	bsb11, Schauenburg (D)
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen (D)
Eppendorf Kühlzentrifuge <i>5415R</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf <i>Reference</i> ® Pipetten	Eppendorf, Hamburg (D)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen (D)
Fluoreszenzmikroskop <i>Axiovert200M</i>	Zeiss, Jena (D)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop, SP5	Leica, Wetzlar (D)
Geldokumentationssystem <i>GelDoc 2000</i>	Biorad, Hercules (USA)
Horizontalschüttler	GFL, Burgwedel (D)
Lichtmikroskop <i>Wilovert</i> ®	Will, Wetzlar (D)
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim (D)
Metallblockthermostat <i>TCS</i>	neoLab®, Heidelberg (D)
Mikrowellengerät	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe (D)
Minizentrifuge <i>GMC-060</i>	neoLab®, Heidelberg (D)
<i>Odyssey Infrared Imaging System</i>	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
PCR Cycler <i>Primus 25</i>	Peqlab, Erlangen (D)
pH-Meter <i>Ø32</i>	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
Pipettierhilfe <i>pipetboy</i>	Integra Bioscience, Chur (CH)
Power Supply <i>PowerPac™ HC</i>	Biorad, Hercules (USA)
Power Supply <i>Standard Power Pack P25</i>	Biometra, Göttingen (D)
Reagenzglasnischer <i>Vortex</i>	neoLab®, Heidelberg (D)
Rotor Ultrazentrifuge <i>SW32</i> , <i>SW41</i> , <i>SW60</i>	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
SDS-Gelkammern <i>Mini-Protean</i>	Biorad, Hercules (USA)
SemiDry Blotapparatur <i>Trans-Blot SD</i>	Biorad, Hercules (USA)
Sicherheitswerkbank <i>BDK SK 1200</i>	BDK, Sonnenbühl-Genkingen (D)
Spektralphotometer <i>Nanodrop ND1000</i>	Peqlab, Erlangen (D)
StepOne™ ABI, RealTime PCR Cycler	Applied Biosystem, Carlsbad (USA)

Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischfuge <i>Spectrafuge</i> ®	neoLab®, Heidelberg (D)
Tischkühlzentrifuge <i>Multifuge 3S-R</i>	Thermo Fisher, Hudson (USA)
Überkopftrotierer	Heidolph, Schwabach (D)
Ultrazentrifuge <i>Optima™ L-100K/-80XP</i>	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
UV-Schirm 302 nm	Bachofer, Reutlingen (D)
Vakuumpumpe <i>Mini-Vac E1</i>	Axonlab, Reichenbach (D)
Waage <i>excellence</i>	Sartorius, Göttingen (D)
Wasserbad <i>MT</i>	Lauda, Lauda-Königshofen (D)

## 2.5 PUFFER UND LÖSUNGEN

### 2.5.1 PUFFER

Blockierungspuffer für IF	2 %	Bovines Serumalbumin (BSA)
	5 %	Glycerin
	0,05 %	Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )
	0,2 %	Tween® 20
	in PBS <sub>def</sub>	
Blockierungspuffer für WB	10 %	Magermilchpulver
	in PBS <sub>def</sub>	
CoIP-Puffer	5 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	1 %	NP40
	20 mM	Tris/HCl, pH 8,0
Lysis-Puffer für EM-Proben	1 mM	EDTA
	0,15 M	NaCl
	1 %	NP40
	10 mM	TrisHCl [pH 7,8]
PBS <sub>def</sub> , pH 7.5 (Phosphatpuffer <sub>defizient</sub> )	0,2 g	KCl
	0,2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,15 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	8 g	NaCl
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
Proteinprobenpuffer (4x)	10 ml	β- Mercaptoethanol
	200 mg	Bromphenolblau
	20 ml	Glycerin
	10 ml	1 M Tris/HCl, pH 6.8
	4 g	SDS
	ad 100 ml	dH <sub>2</sub> O

Proteingellaufpuffer (10x)	144 g 10 g 30 g ad 1 l	Glycin SDS Tris-Base dH <sub>2</sub> O
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,4 % 1 M	SDS Tris/HCl, pH 6.8
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	0,4 % 1,5 M	SDS Tris/HCl, pH 8.8
50× TAE, pH 8,0	100 ml 57,1 g 242 g ad 1 l	0,5 M EDTA, pH 8,0 Essigsäure Tris-Base dH <sub>2</sub> O
TNE-Puffer (1x)	1 mM 150 mM 10 mM	EDTA, pH 8 NaCl Tris/HCl, pH 7.5
Transferpuffer (1x)	100 ml 144 mg 300 mg ad 1 l	Ethanol Glycin Tris dH <sub>2</sub> O
Verdünnungspuffer für WB	1 % 0,1 % in PBS <sub>def</sub>	Magermilchpulver Tween® 20
Waschpuffer für WB	0,1 % in PBS <sub>def</sub>	Tween® 20

## 2.5.2 LÖSUNGEN

Ampicillin-Stammlösung	100 mg ad 1 ml	Ampicillin dH <sub>2</sub> O
Kanamycin-Stammlösung	25 mg ad 1 ml	Kanamycin dH <sub>2</sub> O

## 2.6 WACHSTUMSMEDIEN

### 2.6.1 WACHSTUMSMEDIEN FÜR BAKTERIEN

LB-Agar (1,5 %)	3,75 g ad 250 ml	Bacto™ Agar LB-Medium
LB-Medium	10 g	NaCl

	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Pepton
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
NZY+ Medium	10 g	Caseinhydrolysat
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
	+ 12,5 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>
	+ 12,5 ml	1 M MgSO <sub>4</sub>
	+ 20 ml	20 % Guucose in dH <sub>2</sub> O
SOB Medium	20 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	0,58 g	NaCl
	0,19 g	KCl
	10 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>
	10 ml	1 M MgSO <sub>4</sub>
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O

## 2.6.2 WACHSTUMSMEDIEN FÜR SÄUGERZELLEN

DMEM <sub>10 % FCS + Q+ P/S</sub>	500 ml	DMEM
	50 ml	FCS (Fötales Kälberserum)
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml
DMEM <sub>+ Q</sub>	500 ml	DMEM
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
DMEM <sub>5 % FCS + Q</sub>	500 ml	DMEM
	25 ml	FCS (Fötales Kälberserum)
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
DMEM <sub>2% FCS + Q + P/S</sub>	500 ml	DMEM
	10 ml	FCS (Fötales Kälberserum)
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml
3 % CMC-MEM (1:1)	100 ml	3 % CMC in dH <sub>2</sub> O
	+ 100 ml	2x MEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS)

OPTI-MEM® I

2x MEM

Trypsin-EDTA (0,5%)

Gibco® /InvitrogenTM, Karlsruhe (D)

PAN Biotech GmbH, Aidenbach (D)

Gibco® /InvitrogenTM, Karlsruhe (D)

Gibco® /InvitrogenTM, Karlsruhe (D)

Gibco® /InvitrogenTM, Karlsruhe (D)

## 2.7 NUKLEINSÄUREN UND NUKLEOTIDE

### 2.7.1 NUKLEINSÄUREN ALS GRÖßENMARKER

O'Gene Ruler™ 1 kb plus DNA Ladder	75-20.000 bp	Fermentas, St.Leon Rot (D)
O'Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder	50-1.000 bp	Fermentas, St.Leon Rot (D)

### 2.7.2 SONSTIGE NUKLEINSÄUREN UND NUKLEOTIDE

dATP	2' Desoxyadenosin 5' Triphosphat 10 mM	Peqlab, Erlangen (D)
dCTP	2' Desoxyzytosin 5' Triphosphat 10 mM	Peqlab, Erlangen (D)
dGTP	2' Desoxyguanosin 5' Triphosphat 10 mM	Peqlab, Erlangen (D)
dTTP	2' Desoxythymidin 5' Triphosphat 10 mM	Peqlab, Erlangen (D)

### 2.7.3 DNA-OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER FÜR SEQUENZIERUNGEN / MUTAGENESSEN)

Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Mutierte Nukleotide oder Insertionen sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet, fett gedruckt ist jeweils die insgesamt mutierte Aminosäure. Die Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Die fluoreszenzmarkierte Sonde von der Firma Biomers (Ulm).

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')
1233	pCAGGS, for	CCTTCTTCTTTTCCTACAG
1234	pCAGGS, rev	CCTTTATTAGCCAGAAGTCAG
6054	ZEBOV Seq. Primer	TCACTCCATCACGCTTCTTG
6227	ZEBOV Seq. Primer	CACAAGTTCCACCTCAGAC
6229	ZEBOV Seq. Primer	AGGAGACAACCTGAAGCTAAT
6232	ZEBOV Seq. Primer	GACATTACGATGATGATGAC
6235	ZEBOV Seq. Primer	TAATGCGGAGGTCTGATAAG
6238	ZEBOV Seq. Primer	GGTCTAAAGCCAGTTTATGA
6241	ZEBOV Seq. Primer	GTAACCCAAACCAAAAGTGA
6243	ZEBOV Seq. Primer	AGTGCCGATCTAACATCTCC
6246	ZEBOV Seq. Primer	TATTGCAGTTACCTCGTGAT
6249	ZEBOV Seq. Primer	ATTCGCAGTGAAGAGTTGTC
6252	ZEBOV Seq. Primer	CACATGATTGGACCAAGAAC
6255	ZEBOV Seq. Primer	CTGATGATTTCCAGCAAGAG
6258	ZEBOV Seq. Primer	TAATGCGGAGGTCTGATAAG
6261	ZEBOV Seq. Primer	ACGGATTGTTGAGCAGTATT
6264	ZEBOV Seq. Primer	TGCCAACAGTTCTTAGATGA
6267	ZEBOV Seq. Primer	TCTTGGTACAGTGTTACTTC
6270	ZEBOV Seq. Primer	TCTTCCCCTTAGAGACTGAC
6273	ZEBOV Seq. Primer	GGTGGAGCCTATGGTTTAGT
6276	ZEBOV Seq. Primer	CTCTAAAAGGAGGACTCAAT
6279	ZEBOV Seq. Primer	GTCGTTCCAGTCCTTTCTAA
6282	ZEBOV Seq. Primer	CCATACTGGCTAAGTCATT
6284	ZEBOV Seq. Primer	ATAACGAAAGGAGTCCCTAT
2630	VP30_S29,31A rev	CGATAATTCTCTCT <b>GGcTGATGc</b> TCGTGCTCGAAC
2631	VP30_S30,31A mut, rev	TAATTCTCTCT <b>GGgTGc</b> TGATCGTGCTCGAACATGGTGG
2632	VP30_S42,44,46A mut, rev	GGAACGCGCACTT <b>GTGcGGCGGcCCTTGc</b> TTGACGGTAC
2857	VP30 myc, <u>XhoI</u> rev	GGTGCTCGAGTCA <b>Cagatccttctgagatgagttttgtt</b> CAGGGG TACCCTCATCAGACC
2858	VP30 <u>EcoRI</u> , for	GCAGCAGA <b>AATTCT</b> GGAATGGAAGCTTCATATGAGAGAGGACG
Minigenom-Sonde	5'FAM 3'DDQ1	CCA CAT ATT GAG CCA GTA GCG CGG

## 2.8 VEKTOREN UND REKOMBINANTE PLASMIDE

### 2.8.1 VEKTOREN

pCAGGS-MCS

Institut für Virologie, Marburg (D)

pKan1.1

Institut für Virologie, Marburg (D)

### 2.8.2 REKOMBINANTE PLASMIDE

Vektor	Protein	
pANDY	Minigenom 3E5E_RLuc	Institut für Virologie, Marburg
pANDY	Minigenom del55 trl 3E5E_RLuc	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	GP	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	L	B. Moss, NIH, Bethesda (USA)
pCAGGS	NP	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	NP myc	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	T7	Y. Kawaoka, Wisconsin (USA)
pCAGGS	VP24	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP35	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP35 HA	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP40	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30 flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_AA flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_AA flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_DD flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_S29 flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_S30 flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_S31 flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_S42 flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_S44 flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_S44 flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_E197A flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_1-141 flag (N-Terminus)	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30_142-272 flag (C-Terminus)	Institut für Virologie, Marburg
pAMP	rgZEBOV	G. Neumann, Winnipeg, (CDN)

kloniertes Plasmid		Matrizen	Oligonukleotide	Zielvektor
pCAGGS	VP30_myc	pCAGGS VP30	#2857, #2858	-
pAMP	rgZEBOV_S29	pKAN Kasette GP,VP24, VP30_S29	SK durch RV mit Sall und SacI	pAMP rgZEBOV
pAMP	rgZEBOV_S30	pKAN Kasette GP,VP24, VP30_S30	SK durch RV mit Sall und SacI	pAMP rgZEBOV
pKAN	Kasette GP,VP24, VP30	pAMP rgZEBOV	SK durch RV mit Sall und SacI	pKan
pKAN	Kasette GP,VP24, VP30_S29	pKan Kasette GP,VP24, VP30	#2631, #2632	-
pKAN	Kasette GP,VP24, VP30_S30	pKan Kasette GP,VP24, VP30_S29	#2630	-

Tabelle 1: Verwendete Plasmide. SK: Subklonierung. RV: Restriktionsverdau.

Die Bezeichnung der Oligonukleotide erfolgte mit der internen Labornummer (# n), deren genaue Bezeichnung und Sequenz unter 2.7.3 verzeichnet ist.

## 2.9 PROTEINE, PEPTIDE UND AMINOSÄUREN

### 2.9.1 ENZYME

Alkalische Phosphatase, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (1U/μl)	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
DNaseI (RNase-free DNase Set)	Qiagen, Hilden (D)
Proteinase K (0,9 U/μl)	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
Pwo DNA-Polymerase (1 U/μl)	Peqlab, Erlangen (D)
Restriktionsendonukleasen:	NEB, Frankfurt (D)
EcoRI (20 U/μL), DpnI (10U/μl), MluI (10 U/μl), SacI (10 U/μl), Sall (10 U/μl), XhoI (20 U/μl)	
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	NEB, Frankfurt (D)

### 2.9.2 ANTIKÖRPER

#### Primärantikörper

Name	Spezies	Firma	Verdünnung	
			IFA	WB
α- flag™ M2	Maus	Sigma-Aldrich, München (D)	1:50	1:500
α- non pS29 (VP30)	Kaninchen	Biogenes, Berlin (D)	1:50	1.100
α- HA	Maus	Covance, Princeton (USA)	1:100	
α- HA	Kaninchen	Sigma-Aldrich, München (D)	-	1:500
α- HA Biotinyliert	Maus	Sigma-Aldrich, München (D)	-	1:500
α- myc	Kaninchen	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz (USA)	1:50	1.500
α- pS29 (VP30)	Kaninchen	Biogenes, Berlin (D)	1:50	1.100
α- Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich, München (D)	-	1:1000

$\alpha$ - VP30	Meerschw.	Institut für Virologie, Marburg (D)	1:100	1.100
$\alpha$ - ZEBOV	Ziege	Institut für Virologie, Marburg (D)	1:2000	
$\alpha$ - ZEBOV GP/NP	Ziege	Institut für Virologie, Marburg (D)	-	1:2000
$\alpha$ - ZEBOV NP	Huhn	Institut für Virologie, Marburg (D)	1:1000	1:2000
$\alpha$ - ZEBOV NP B6C5	Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)	1:20	-

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper.

**Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzanalysen**

Name		Spezies	Firma	Verdünnung
$\alpha$ - Maus	AMCA	Pferd	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:100
$\alpha$ - Kaninchen	AMCA	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:100
$\alpha$ - Huhn	Rhodamin	Ziege	Dianova, Hamburg (D)	1:200
$\alpha$ - Ziege	Rhodamin	Esel	Dianova, Hamburg (D)	1:100
$\alpha$ - Kaninchen	Alexa 488	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:100
$\alpha$ - Maus	FITC	Ziege	Dianova, Hamburg (D)	1:100
$\alpha$ - Meerschweinchen	Alexa 594	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:200
DAPI (4',6-Diamidino-2'-Phenylindol)				1:10.000

**Sekundärantikörper für Western Blot Analysen**

Name		Spezies	Firma	Verdünnung
$\alpha$ - Kaninchen	Alexa 680 nm	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:5000
$\alpha$ - Maus	Alexa 680 nm	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:5000
$\alpha$ - Ziege	Alexa 680 nm	Esel	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:5000
Streptavidin	Alexa 680 nm	-	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:5000
$\alpha$ - Huhn	IRDye 780 nm	Esel	Li-Cor, Bad Homburg (D)	1:5000
$\alpha$ - Kaninchen	IRDye 780 nm	Ziege	Li-Cor, Bad Homburg (D)	1:5000
$\alpha$ - Meerschweinchen	IRDye 780 nm	Ziege	Li-Cor, Bad Homburg (D)	1:5000

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper.

**2.9.3 AFFINITÄTSGELE**

Antikörper-gekoppelte Agarosen:

$\alpha$ -flag M2 Affinity Gel	Maus	Sigma-Aldrich, München (D)
$\alpha$ -HA Affinity Gel	Maus	Sigma-Aldrich, München (D)

**2.9.4 PROTEINMARKER**

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	10-170 kDa	Fermentas, St.Leon Rot (D)
--------------------------------------	------------	----------------------------



PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus      10-250 kDa      Fermentas, St.Leon Rot (D)

## 2.10 ZELLEN

### 2.10.1 PROKARYOTISCHE ZELLEN

E. coli XL1 blue      Stratagene, Heidelberg (D)

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]

E. coli XL10 gold      Stratagene, Heidelberg (D)

Genotyp: *TetrΔ (mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* The [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr) Amy Camr]

### 2.10.2 EUKARYOTISCHE ZELLEN

HEK293-Zellen      humane embryonalen Nierenzellen

HuH7-Zellen      humane Hepatomazellen

VeroE6-Zellen      Nierenzellen, Grüne Meerkatze

## 2.11 VERWENDETE SOFTWARE

Axiovision Rel. 4.6      Immunfluoreszenzaufnahmen

Chromas      Bearbeitung von Sequenzen

Clone Manager 9      Klonierungsstrategien

<http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test.html>      Statistische Auswertung (Student T-Test)

LiCor Odyssey Imaging 2.1      Detektion von Western Blots und deren Quantifizierung

Photoshop CS3      Bildbearbeitung

StepOne 2.1      Quantitative RealTime PCR

### 3 METHODEN

Die hier verwendeten und beschriebenen Methoden wurden teilweise aus der Diplomarbeit von Nadine Biedenkopf übernommen (23). Modifizierungen und Abweichungen sind angegeben.

#### 3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

##### 3.1.1 AMPLIFIKATION VON DNA-SEQUENZEN DURCH POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Durch eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* amplifiziert. Die beiden sequenzspezifischen Primer (15-25 Nukleotide) binden jeweils an einen DNA-Strang und rahmen so die Zielsequenz ein. Je nach Klonierungsstrategie kann das 5'-Ende des Primers durch zusätzliche Sequenzen für Schnittstellen von Restriktionsenzymen oder bestimmte Epitope (z.B. *flag*-Tag) modifiziert sein. Die hier verwendete hitzestabile *Pwo* DNA-Polymerase verfügt neben ihrer 5'-3'-Polymerasefunktion über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die eine hohe Lesegenauigkeit gewährleistet. Der Reaktionszyklus wird etwa 30 Mal wiederholt, wobei die zu amplifizierende DNA exponentiell im Reaktionsgemisch angereichert wird. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden über ein präparatives DNA-Agarosegel aufgetrennt (3.1.7) und durch Gelextraktion gereinigt (3.1.6).

Reaktionsansatz:	100 ng	DNA-Matrize
	30 µM	Vorwärts-Primer
	30 µM	Rückwärts-Primer
je	2 µl	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	10 µl	10 x Puffer für <i>Pwo</i> DNA-Polymerase (komplett)
ad	98 µl	dH <sub>2</sub> O
	2 µl	<i>Pwo</i> DNA-Polymerase (5U/µl)

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94 °C	2 Min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	30
Annealing	50-60 °C	1 Min	
Elongation	72 °C	1 Min / kb	
Elongation	72 °C	2 Min	1
Ende	4 °C	∞	1

### 3.1.2 KOLONIE-POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Die Kolonie-PCR bietet eine schnelle und unkomplizierte Methode, DNA zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren, ohne diese zuvor aus Bakterien isolieren und aufreinigen zu müssen. Dabei werden einzelne Bakterienklone nach Transformation auf einer LB-Platte (3.1.11) mit einer Pipettenspitze (10 µl) aufgenommen und 100 µl LB-Medium für 2 Min mit den Bakterien inokuliert. Nach 4-6 h Inkubation bei 37 °C kann die Kultur direkt in die PCR eingesetzt werden. Hierfür wird ein *Taq* DNA Polymerase Kit von Fermentas verwendet.

Reaktionsansatz:	5 µl	Bakterienkultur
	0,5 µM	Vorwärts-Primer
	0,5 µM	Rückwärts-Primer
	2,5 µl	dNTP Mix (je 2 mM)
	2,5 µl	10 x <i>Taq</i> Puffer with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0,5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,125 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5U/µl)
ad	25 µl	dH <sub>2</sub> O

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	1 Min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	30
Annealing	50-60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 Min / kb	
Elongation	72 °C	2 Min	1
Ende	4 °C	∞	1

Im Anschluss an die PCR kann die DNA direkt sequenziert werden (3.1.15). Die restliche Bakterienkultur kann außerdem zur Anzucht größerer Kulturen und anschließender Isolierung der DNA verwendet werden (3.1.12 und 3.1.13).

### 3.1.3 ORTSGERICHTETE *IN VITRO*-MUTAGENESE

Mit Hilfe des QuikChange™ Multi Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) ist es möglich, mehrere Punktmutationen, kurze Deletionen oder Insertionen in Plasmid-DNA einzubringen. Die Methode beruht auf einer PCR-Reaktion (3.1.1), bei der das zu mutagenisierende Plasmid mittels eines Polymerase-Enzymmixes amplifiziert wird. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Verwendung von bis zu vier mutagenisierenden Forwärts-Primern gleichzeitig; komplementär gerichtete Rückwärts-Primer werden nicht benötigt.

Die anschließende Selektion erfolgt mit der Restriktionsendonuklease DpnI. Dieses Enzym baut methylierte DNA vollständig ab, so dass die methylierte Template-DNA (aus Bakterienzellen isoliert) aus dem Ansatz entfernt wird, nicht aber die durch PCR neusynthetisierte DNA. Die

amplifizierten Plasmide können direkt in hitzekompetente E.coli XL10Gold-Zellen transformiert werden (3.1.11).

Reaktionsansatz:	10 ng	DNA-Matrize
je	125 ng	Vorwärts-Primer
	1 µl	dNTP Mix (25 mM)
	0,5 µl	QuikSolution™
	2,5 µl	10 x QuikChange™ Multi Puffer
ad	25 µl	dH <sub>2</sub> O
	0,5 µl	QuikChange™ Multi Enzymmix (2,5U/ µl)

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	1 Min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	30
Annealing	55 °C	1 Min	
Elongation	65 °C	2 Min / kb	
Ende	4 °C	∞	1

#### 3.1.4 REVERSE TRANSKRIPTION POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-PCR)

Zur Verifizierung und anschließender Sequenzierung rekombinanter Viren muss die unter BSL4-Bedingungen isolierte virale RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden und anschließend in einem PCR-Schritt amplifiziert werden. Dies erfolgt mit dem Titan™ One Tube RT-PCR Kit von Roche nach Herstellerangaben unter Verwendung von VP30-sequenzspezifischen Primern. Zur Überprüfung der RT-PCR werden 5 µl des Ansatzes auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen (3.1.7), bevor die cDNA sequenziert werden kann (3.1.15).

Reaktionsansatz 1:	5 µl	RNA
	2,5 µl	DTT
	1 µl	RiboLock RNase Inhibitor (40U /µl, Fermentas)
	4 µl	dNTP Mix (je 10 mM)
	2 µl	Primer vorwärts (10 µM)
	2 µl	Primer rückwärts (10 µM)
	8,5 µl	dH <sub>2</sub> O (RNase-frei)
	<hr/> 25 µl	
Reaktionsansatz 2:	10 µl	5 x RT-PCR Puffer
	14 µl	dH <sub>2</sub> O (RNase-frei)
	1 µl	Titan™ One Tube RT-PCR Enzym Mix
	<hr/> 25 µl	

Beide Reaktionsansätze werden gemischt und anschließend kurz zentrifugiert.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
cDNA Synthese	50 °C	30 Min	1
Denaturierung	94 °C	2 Min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	10
Annealing	55-45 °C	30 s	
Elongation	68 °C	45 s	
Denaturierung	94 °C	30 s	30
Annealing	45 °C	30 s	
Elongation	68 °C	45 + 5 s pro Zyklus	
	68 °C	7 Min	
Ende	4 °C	∞	

### 3.1.5 REVERSE TRANSKRIPTION UND REALTIME POLYMERASE-KETTENREAKTION

Für die quantitative Bestimmung von Minigenomkopien in Zellen und in iVLPs (3.2.5) wird das Prinzip einer Reversen Transkription mit anschließender RealTime PCR verwendet (Two Step RT und RealTime PCR™, PeqLab). Zur Erhöhung der RNA-Menge in den iVLPs wird ein dreifacher Ansatz transfiziert und die Überstände werden gepoolt (3 wells einer 6-well Zellkulturplatte). Die in die Reverse Transkription eingesetzte RNA wird zur Normalisierung an die Menge freigesetzter iVLPs angeglichen (VP40-Proteinmenge im Western Blot, 3.4.3). Zur Isolierung der RNA aus den VLP-Synthesezellen Zellen wird 1/3 der Zellen verwendet, ein weiteres Drittel dient der Normalisierung der RNA in Zellen, indem die enzymatische Aktivität der Firefly-Luciferase bestimmt wird, die ein Maß für die Transfektionseffizienz darstellt. Das restliche Zelllysate wird verworfen.

Im ersten Schritt wird zunächst die aus Zellen oder iVLPs isolierte RNA (3.1.6) mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Hierbei wird nur ein Primer verwendet, der spezifisch für die replizierte vRNA ist. Die unterschiedlich eingesetzten Mengen an RNA ergeben sich durch die oben beschriebene Normalisierung. Als Negativkontrollen dienen eine Probe ohne RNA (Wasserkontrolle) sowie eine Probe ohne Reverse Transkriptase (ØRT) zur Überprüfung von DNA-Kontaminationen.

Reaktionsansatz:	2-10 µl	RNA (nach DNase Verdau)
	2 µl	Primer Luc (+) 10 µM
	0,5 µl	dNTPs Mix (je 10 mM)
ad	14 µl	dH <sub>2</sub> O

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	65 °C	10 Min
	Auf Eis	2 Min

+	4 µl	5 x Puffer
	0,125 µl	Reverse Transkriptase
	0,5 µl	RNase Inhibitor
	1,375 µl	dH <sub>2</sub> O (RNase-frei)

	Temperatur	Zeit
cDNA Synthese	37 °C	50 Min
Hitzeinaktivierung	70 °C	15 Min
Ende	4 °C	∞

Die cDNA dient anschließend in einem weiteren PCR-Schritt als Template. Durch Zugabe eines interkalierenden Farbstoffes (SYBR-Green oder wie hier eine sequenzspezifische Sonde) ist es möglich, die Synthese der Amplifikate in Echtzeit zu messen. Die Sonde trägt als 5'-Reporterfarbstoff FAM (6-FAM-Phosphoramidit) und als Quencher am 3'-Ende DDQ-1 (Deep Dark Quencher-1) und ist spezifisch für eine 24 Nukleotid-lange Sequenz innerhalb des Minigenoms. Durch das Mitführen von DNA-Standards einer definierten Menge Minigenom kann die Kopienanzahl des Minigenoms in den jeweiligen Proben ermittelt werden. Als Standard wird DNA des Minigenoms (pANDY-3E5E Renilla-Luciferase) verwendet: jeweils  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  und  $10^9$  Minigenomkopien. Die Messung erfolgt auf dem ABI StepOne™.

Reaktionsansatz:	5 µl	cDNA
	12,5 µl	2 x Puffer SensiMix
	0,5 µl	Primer Luc (+) 10 µM
	0,5 µl	Primer Luc (-) 10 µM
	1 µl	Sonde 1:40 (final 200 nM)
	5,5 µl	dH <sub>2</sub> O (RNase-frei)

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 Min	
Denaturierung	95 °C	10 s	40
Annealing	60 °C	30 s	
Elongation	95 °C	15 s	

### 3.1.6 AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN

Vor der Verwendung von DNA oder RNA in molekularbiologischen Experimenten ist es erforderlich, Kontaminationen mit Phenol, Chloroform, Ethanol, EDTA, Detergenzien, Salzen oder Proteinen zu entfernen.

**AUFREINIGUNG VON DNA**

DNA-Fragmente, die größer als 100 bp sind, können nach biochemischen Reaktionen, wie zum Beispiel PCR (3.1.1) oder Restriktionsverdau (3.1.8), mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgt über eine Säulenmatrix und wird entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung durchgeführt und in 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

Bei präparativen Agarosegelen (3.1.7) erfolgt die Aufreinigung der DNA mit dem QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen). Dabei wird die DNA entsprechend der dem Kit beiliegenden Arbeitsanleitung aus dem Gel isoliert und in 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

**AUFREINIGUNG VON RNA**

Die Aufreinigung von zellulärer RNA wird mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach beiliegender Arbeitsanleitung für tierische Zellen durchgeführt. Es erfolgt hierbei zur Entfernung möglicher DNA-Kontaminationen der optionale DNAaseI Verdau (Qiagen) für 20 Minuten auf der Säule.

Zur Isolation von RNA aus iVLPs wird das QIAAMP Viral RNA Kit (Qiagen) verwendet. Ein DNase Verdau mit DNaseI (Qiagen) wird hier erst im Anschluss an die RNA-Isolierung nach beiliegender Arbeitsanweisung durchgeführt. Die RNA wird danach erneut mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt.

Zur Isolation viraler RNA-Proben aus dem BSL4 Labor wird ebenfalls das QIAamp Viral RNA Kit verwendet. Nach Inaktivierung der Proben mit 560 µl AVL-Puffer (komplettiert mit Carrier-RNA) und 560 µl 100%igem Ethanol werden diese in frische Reaktionsgefäße überführt und ausgeschleust. DNA-Kontaminationen werden hier durch einen 2-stündigen DpnI-Verdau (3.1.8) entfernt. Die RNA wird danach erneut mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt.

Die RNA wird kurzfristig bei -20 °C, längerfristig bei -80 °C gelagert.

**3.1.7 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN**

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Agarosegel elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Analytische Agarosegele verwendet man zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder enzymatischen Reaktionen, wohingegen präparative Agarosegele zur Aufreinigung von Nukleinsäuren benutzt werden. Die Gele unterscheiden sich in der eingesetzten Konzentration der Agarose und dem einzusetzenden Probenvolumen.

Agarosegel: 1-2 % (w/v) Agarose, in TAE-Puffer gelöst

Laufpuffer: TAE-Puffer; pH 8,0

Die Agarose wird durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und in eine entsprechende Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben (10 µl bei analytischen bzw. 40 µl bei präparativen DNA-Gelen) werden mit 1/6 Volumen 6 x MassRuler™ Loading Dye (Fermentas) versetzt und zusammen mit einem DNA-Längenstandard im polymerisierten Agarosegel bei 80-100 Volt und

maximalem Stromfluss aufgetrennt. Das Gel wird anschließend in wässriger Ethidiumbromidlösung (20 Min Färbung, 1:10.000, Stock 10 mg/ml) gefärbt. Im Falle eines präparativen Agarosegels werden die gewünschten DNA-Banden auf einem UV-Schirm ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Im Anschluss an die Färbung bzw. das Ausschneiden der DNA wird diese mit Hilfe des Geldokumentationssystems GelDoc 2000 (Biorad) visualisiert.

### 3.1.8 VERDAU VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Doppelsträngige DNA-Moleküle (dsDNA) können mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen an spezifischen Erkennungsstellen hydrolytisch gespalten werden. Diese Endonukleasen erkennen palindromische Sequenzen im DNA-Doppelstrang, an denen der Phosphodiesterstrang geöffnet wird. Man kann sie präparativ zum Herausschneiden eines Inserts aus einem Vektor oder zur Analyse von DNA verwenden, da zwei DNA-Moleküle, die sich in Anzahl oder Position der Schnittstellen unterscheiden, nach einem analytischen Restriktionsverdau und Gelelektrophorese im Agarosegel unterschiedliche Bandenmuster erzeugen (3.1.7). Der Reaktionsansatz wird entsprechend der Herstellerangaben bezüglich Pufferbedingungen, Temperaturoptimum und Zusatz von BSA inkubiert. Dies geschieht je nach Aktivität des verwendeten Enzyms für 2-4 Stunden. Die Aufreinigung erfolgt mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (3.1.6) oder über ein präparatives Agarosegel (3.1.7) mit anschließender Gelextraktion (3.1.6).

Ansatz für analytischen Verdau:	0,1 – 0,5 $\mu\text{g}$	DNA
	1 $\mu\text{l}$	10 x Puffer geeigneter Ionenstärke
	(1 $\mu\text{l}$	10 % BSA, optional)
	1-5 U	Restriktionsendonuklease
	ad 10 $\mu\text{l}$	dH <sub>2</sub> O

Ansatz für präparativen Verdau:	5 $\mu\text{g}$	DNA
	5 $\mu\text{l}$	10 x Puffer geeigneter Ionenstärke
	(5 $\mu\text{l}$	10 % BSA, optional)
	10-20 U	Restriktionsendonuklease
	ad 50 $\mu\text{l}$	dH <sub>2</sub> O

### 3.1.9 DEPHOSPHORYLIERUNG LINEARISierter VEKTOREN

Eine Behandlung der mit Restriktionsendonukleasen verdauten Plasmid-DNA mit alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) dient der Entfernung der 5'-Phosphatgruppen. So kann eine Religation der linearisierten Plasmide verhindert werden. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde bei 37 °C, dann erfolgt eine erneute Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  SAP und



eine 30 minütige Inkubation bei 52 °C. Die DNA wird anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt (3.1.6), um die bei einer Ligation (3.1.10) möglicherweise störenden Substanzen zu entfernen.

Reaktionsansatz:	44 µl	Vektor-DNA nach präparativem Restriktionsendonuklease-verdau (3.1.8)
	5 µl	10 x SAP Puffer
	1 µl	SAP (1 U/µl)

### 3.1.10 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN IN LINEARISIERTE VEKTOREN

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe des einen DNA-Stranges mit der freien 3'-OH-Gruppe des zweiten DNA-Doppelstranges. Ein über PCR (3.1.1) und/oder Restriktionsendonukleaseverdau (3.1.8) erhaltenes Insert kann so in einen linearisierten und dephosphorylierten Vektor (3.1.9) ligiert werden. Zur Kontrolle wird eine Religationskontrolle mitgeführt, bei der nur linearisierte Vektor-DNA und statt der Ligase dH<sub>2</sub>O eingesetzt werden. Die Ligationsansätze werden für mindestens eine Stunde bei RT inkubiert und im Anschluss daran in Z-kompetente E.coli XL1-Blue-Zellen transformiert (3.1.11). Bei Vollelängeplasmiden wird aufgrund der Plasmidgröße über Nacht für 16 h bei 14 °C ligiert.

Ansatz:	100 – 200 ng	verdaute, gereinigte Insert-DNA
	25 – 50 ng	verdaute, gereinigte, SAP-behandelte Vektor-DNA
	1 µl	10 x Ligationspuffer mit 10 mM ATP
	0,5 µl	T4 DNA Ligase (4 U/µl)
	ad 15 µl	dH <sub>2</sub> O

### 3.1.11 TRANSFORMATION VON PLASMID-DNA IN BAKTERIENZELLEN

Rekombinante Plasmide können in Bakterienzellen quantitativ vermehrt werden. Zur Aufnahme fremder Plasmid-DNA werden die Bakterien zunächst mit dem Z-Competent E.coli Transformation Kit™ and Buffer Set (ZymoResearch) entsprechend beiliegendem Protokoll behandelt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Z-kompetenten E.coli-Zellen (XL1-Blue) werden auf Eis aufgetaut. Die Transformation erfolgt durch die Zugabe von 100 µl Bakteriensuspension zur DNA-Lösung (z.B. 10 µl Ligationsansatz oder 10 ng Plasmid-DNA) und anschließender 20 minütiger Inkubation auf Eis.

PCR-Produkte des QuikChange™ Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (3.1.3) werden entsprechend der beiliegenden Arbeitsanwendung in hitzekompetente E.coli-Zellen (XL10Gold) transformiert. Die Transformation erfolgt, indem 45 µl der Bakteriensuspension (komplettiert mit β-Mercaptoethanol) mit 3 µl des PCR-Produkts gemischt, auf Eis inkubiert und

anschließend in NZY-Medium einem Hitzeschock (30 s, 42 °C) unterzogen werden. Vor dem Ausplattieren werde die Bakterien in 500 µl Medium 1 h bei 37 °C schüttelnd vorinkubiert.

#### **3.1.12 ANZUCHT UND SELEKTION REKOMBINANTER BAKTERIEN**

Um transformierte Bakterienzellen, die Plasmid-DNA aufgenommen haben, von nicht transformierten Bakterienzellen unterscheiden zu können, tragen Vektor-Pasmide zur Selektion ein Antibiotika-Resistenzgen. Nach Transformation der Bakterien erfolgt die Animpfung von LB-Agarplatten für 16 h bei 37 °C, die mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt sind (Kanamycin 25 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml, für die Transformation von Volllängeplasmiden 50 µg Ampicillin/ml). Es bilden nur die Bakterien Kolonien, die durch Transformation den Vektor mit entsprechendem Antibiotika-Resistenzgen aufgenommen haben.

#### **3.1.13 ISOLIERUNG VON PLASMID - DNA AUS BAKTERIEN**

Plasmidpräparationen aus Bakterienkulturen werden entweder im kleinen Maßstab als Mini-Präparation (3 ml) oder im großen Maßstab als Maxi-Präparation (100 ml) durchgeführt. Dafür werden einzelne Bakterienkolonien in LB-Medium, komplettiert mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 25 µg/ml), aufgenommen und über Nacht auf einem Schüttler bei 200 Upm und 37 °C inkubiert. Die Plasmide werden anschließend laut Herstellerangaben mit dem peqGold Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab) bei Mini-Präparationen oder mit dem HiSpeed® Plasmid Maxi Kit (Qiagen) bei Maxi-Präparationen isoliert. Die Elution erfolgt in 50 µl (Mini-Präparation) bzw. 750 µl (Maxi-Präparation) dH<sub>2</sub>O.

Zur Analyse der gewonnenen Plasmid-DNA aus Mini-Präparationen wird ein Restriktionsverdau (3.1.8) mit ca. 5 µl Eluat durchgeführt, das anschließend auf einem analytisches Agarosegel aufgetrennt wird (3.1.7). Die quantitative und qualitative Untersuchung der Plasmid-DNA erfolgt mit dem Photometer (Nanodrop® ND1000) (3.1.14). Anschließend kann die DNA-Präparation durch Sequenzierung überprüft werden (3.1.15).

#### **3.1.14 KONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN VON NUKLEINSÄUREN**

Zur Konzentrationsbestimmung wässriger DNA-Lösungen wird deren Absorptionsvermögen photometrisch mit Hilfe des Nanodrop® ND1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm analysiert. Die optische Dichte bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) ist direkt proportional zu ihrem Nukleinsäuregehalt.

Für doppelsträngige DNA gilt:  $OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 = \text{DNA-Gehalt in } \mu\text{g/ml}$ .

Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  erlaubt eine Aussage über die Reinheit von Nukleinsäurepräparationen. Reine Lösungen sind durch Quotienten zwischen 1,6 und 2,0 charakterisiert. Verunreinigungen durch Proteine ergeben einen Wert kleiner als 1,6; Kontaminationen durch Phenol oder RNA hingegen ergeben deutlich höhere Quotienten.

### 3.1.15 DNA-SEQUENZIERUNG

Zur Analyse der zu sequenzierenden DNA werden die Proben an die Firma SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH gesendet, wobei die DNA-Proben wie folgt vorbereitet werden.

Ansatz:           200 – 600 ng   gereinigte Plasmid-DNA oder PCR-Produkt  
                   20 pmol   Primer  
                   ad 7 µl    dH<sub>2</sub>O

Vor dem Versenden von EBOV Volllängeplasmiden werden diese noch einem 2stündigen Restriktionsverdau (3.1.8) mit *MluI* unterzogen, welches die Plasmide linearisiert.

## 3.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

### 3.2.1 KULTIVIERUNG VON HEK293-, HUH7- UND VEROE6- ZELLEN

Diese permanenten Zelllinien werden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* in Gegenwart von 10 % Fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), L-Glutamin (Q) und Penicillin/Streptomycin (P/S) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (DMEM<sub>10%FCS+Q+P/S</sub>). Die Passage der Zelllinien findet alle drei bis vier Tage statt. Der konfluente Zellrasen wird nach Abnahme des Zellkulturmediums zweimal mit ca. 10 ml erwärmten PBS<sub>def</sub> gewaschen und durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle wird durch Zugabe von 8 ml DMEM<sub>10%FCS+Q+P/S</sub> die Reaktion abgestoppt, die Zellen resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturflaschen bzw. -platten ausgesät.

Wenn HEK293-Zellen zur Produktion und Analyse von Virus-ähnlichen Partikeln (iVLPs, 3.2.5) genutzt und dadurch 72 h bei 37 °C inkubiert werden sollen, so ist es nötig, die 6 well-Zellkulturplatten zuvor mit Hilfe von Poly-D-Lysin (0,1 mg/ml) zu beschichten. Dazu werden die 6 well-Platten mit ca. 1 ml pro well für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert, danach zweimal mit PBS<sub>def</sub> gewaschen und die Zellen darauf ausgesät. Durch die Beschichtung mit Poly-D-Lysin wird verhindert, dass sich die HEK293-Zellen leicht vom Boden der Zellkulturplatte ablösen.

### 3.2.2 TRANSIENTE DNA-TRANSFEKTION MIT TRANSIT®

Um DNA in eukaryotische Zellen zu transferieren, wird deren negative Ladung durch Komplexbildung mit kationischen Lipiden maskiert. Die DNA-Lipidkomplexe lagern sich an die Zellmembran und passieren diese, so dass eine Expression von Proteinen in Zellen ermöglicht wird. Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion passagiert (Transfektionszeitpunkt ca. 60 % Konfluenz). Die Transfektionsansätze werden entsprechend der Herstellerempfehlungen von TRANSIT® angesetzt (3 µl TRANSIT®/ µg DNA bzw. für Virus-Rescues 7 µl TRANSIT®/ µg DNA).

Pro well einer 6 well- Platte:	Ansatz I	3 µl TransIT®
		100 µl Optimem
	Ansatz II	1 µg DNA
		100 µl Optimem

Die Ansätze I und II werden zunächst separat 5 Minuten bei RT inkubiert, anschließend vereint, gemischt und erneut für 15 Minuten bei RT inkubiert. In dieser Zeit wird das FCS-haltige Wachstumsmedium von den Zellen abgenommen und diese einmal DMEM<sub>+Q</sub> gewaschen. Anschließend werden pro well einer 6 well-Platte 2 ml DMEM<sub>+Q</sub> vorgelegt, denen dann nach Ablauf der Inkubationszeit 200 µl des Transfektionsansatzes tropfenweise zugesetzt werden. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung. Nach einem Tag wird bei längeren Experimenten ein Mediumwechsel zu 3 ml DMEM<sub>10%FCS+Q+P/S</sub> durchgeführt.

Eingesetzte DNA-Mengen (sofern nicht anders angegeben):

Immunfluoreszenzanalyse (3.4.1):	500 ng DNA pro Plasmid
Co-Immunpräzipitation (3.2.4):	1 µg DNA pro Plasmid
Expression für Western Blot (3.2.3):	1 µg DNA pro Plasmid
iVLP-Assay (3.2.5):	insgesamt 2,5 µg DNA
Virus-Rescue (3.3.1):	insgesamt 2,1 µg DNA, 7 µl TransIT®/ µg DNA

Differenzen der DNA-Menge werden mit Leervektor (pCAGGS+MCS) ausgeglichen.

### 3.2.3 ERNTE VON ZELLEN ZUR ANALYSE IM WESTERN BLOT

Transfizierte Zellen werden 24 h p.t. einmal mit PBS<sub>def</sub> gewaschen. Die Ernte der Zellen erfolgt in 500 µl PBS<sub>def</sub> pro well einer 6 well-Zellkulturschale, die mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt werden. Die Zellen werden in ein Eppendorfröhrchen überführt und für 1 Minute bei 3000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden durch Zugabe von 80 µl 1 x *Cell Extraction Buffer* (CEB, Invitrogen) für 20 Minuten bei 4°C lysiert. Der Lysispuffer enthält Phosphatase-Inhibitoren, so dass phosphorylierte Proteine stabilisiert werden. Der Zelldebris wird für 5 Minuten bei 13000 Upm abzentrifugiert. Vom Überstand werden 12 µl mit 4 µl 4 x Probenpuffer (PP) versetzt.

RecEBOV-infizierte Zellen (75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche) werden 72 h p.i durch Abkratzen in 5 ml PBS<sub>def</sub> geerntet. Die Zellen werden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und in einer Megafuge 1.0 R (Heraeus) für 5 Min bei 5000 Upm pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgt die Lyse in 640 µl 1 x *Cell Extraction Buffer* für 30 Minuten bei 4°C. Der Zelldebris wird für 5 Minuten bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 220 µl 4 x PP versetzt und 15 Minuten bei 96 °C inkubiert. Nach Überführung in ein neues Röhrchen können die

Proben aus dem BSL4-Labor ausgeschleust werden. Vor der Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot werden sie erneut bei 95 °C aufgekocht (3.4.2 und 3.4.3).

#### 3.2.4 IMMUNPRÄZIPITATION MIT ANTI-FLAG UND ANTI-HA AGAROSE

Die Immunpräzipitation dient der Fällung von Proteinen durch Antigen-Antikörperkomplexe, die an Agarosen oder Sepharosen gebunden sind. Dadurch lässt sich die Interaktion von zwei Proteinen nachweisen. Die hier beschriebenen Immunpräzipitationen wurden mit kommerziell erhältlichen Agarosen,  $\alpha$ -flag Agarose und  $\alpha$ -HA Agarose (beide Sigma), durchgeführt. Dabei sind die jeweiligen Antikörper bereits kovalent an die Agarose gekoppelt.

Die Transfektion der zu untersuchenden Proteine erfolgt wie unter 3.2.2 beschrieben in HEK293-Zellen, die in 6 well-Zellkulturschalen ausgesät sind. Dabei werden jeweils 1 µg DNA pro Plasmid eingesetzt, sofern nicht anders angegeben. 48 h p.t. erfolgt die Lyse der Zellen. Dazu werden die Zellen mit PBS<sub>def</sub> gewaschen und in 1 ml PBS<sub>def</sub> abgekratzt. Nach Überführen in ein Reaktionsgefäß werden die Zellen bei 4000 Upm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird anschließend in 500 µl CoIP-Puffer, der zuvor mit 0,1 % Triton X100 komplettiert wurde, für 20 Minuten bei RT lysiert. Der Zelldebris wird für 10 Minuten bei 13.000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Zur Expressionskontrolle (Input) dienen 45 µl des Zelllysats, die mit 15 µl 4 x PP versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert werden. 400 µl des Zelllysats werden mit 35 µl der jeweiligen Agarose (1:1 Gemisch in CoIP-Puffer) gemischt, die zuvor dreimal mit CoIP-Puffer bei 4000 Upm gewaschen wurde. Die Präzipitation erfolgt für 2 h bei 4 °C auf dem Überkoprotierer. Anschließend wird die Agarose viermal mit 1 ml CoIP-Puffer bei 4000 Upm und 4 °C gewaschen und 45 µl 4 x PP zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 95 °C werden alle Proben kurz abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (3.4.2 und 3.4.3).

#### 3.2.5 INFEKTIÖSER EBOLAVIRUS SPEZIFISCHER VLP-ASSAY

Bei einem iVLP-Assay werden Virus-ähnliche Partikel (*virus-like particles*, VLPs) generiert, die statt der genomischen EBOV-RNA eine Minigenom-RNA enthalten. Eine detaillierte Beschreibung des iVLP-Assays findet sich unter 1.6.1. HEK293-Zellen (ausgesät auf Poly-D-Lysin beschichteten 6 well-Platten, 60 % konfluent) werden durch TransIT® mit folgenden Plasmiden transfiziert (VLP-Synthesezellen) (3.2.2). Ein Ansatz entspricht der Transfektion von 1 well (6-well Platte). Aus den Plasmiden 1-9 wird ein Mastermix hergestellt und VP30<sub>wt</sub> bzw. die verschiedenen VP30<sub>Mutanten</sub> separat zu den Ansätzen pipettiert.

20-24 h nach der Transfektion wird das Transfektionsmedium abgenommen und durch 3 ml DMEM<sub>10%FCS+Q+P/S</sub> ersetzt.

	Plasmid	Menge	Promotor
1	pCAGGS <b>VP40</b>	250 ng	β-chicken actin
2	pCAGGS <b>VP24</b>	30 ng	β-chicken actin
3	pCAGGS <b>GP</b>	250 ng	β-chicken actin
4	pCAGGS <b>VP35</b>	125 ng	β-chicken actin
5	pCAGGS <b>L</b>	1000 ng	β-chicken actin
6	pCAGGS <b>NP</b>	125 ng	β-chicken actin
7	pCAGGS <b>T7 Polymerase</b>	250 ng	β-chicken actin
8a	pANDY <b>3E-5E Renilla Luciferase (Minigenom)</b>	250 ng	T7
8b	pANDY <b>del55trl 3E-5E Renilla Luciferase</b> (replikationsdefizientes Minigenom)	250 ng	T7
9	pGL4 ( <b>Firefly-Luciferase</b> )	100 ng	SV40
10	pCAGGS <b>VP30 bzw Mutante</b>	100 ng	β-chicken actin

### Analyse der iVLPs

72 h nach Transfektion werden die Überstände zur Analyse der entstandenen iVLPs abgenommen und 10 Minuten lang bei 2500 Upm zentrifugiert. In Ultraclear™-Zentrifugenröhrchen (Beckman) für SW60 Ultrazentrifugen-Rotoren werden 1 ml einer 20 %igen Sucrose-Lösung (in 1 x TNE-Puffer) vorgelegt und vorsichtig mit dem zuvor zentrifugierten Zellkulturüberstand überschichtet. Die Zentrifugenröhrchen werden mit PBS<sub>def</sub> aufgefüllt, austariert und in der Ultrazentrifuge für 2 Stunden bei 4 °C und 40.000 Upm in einem SW60-Rotor zentrifugiert. Bei mehrfachen Ansätzen werden dem Volumen entsprechende Rotoren verwendet und die Anzahl der Umdrehungen angepasst.

Anschließend wird der Überstand dekantiert, die Röhrchen vorsichtig trocken gewischt und das Pellet in 55 µl PBS<sub>def</sub> resupendiert.

Zur Normalisierung der für die Infektion eingesetzten iVLPs wird die VP40-Proteinmenge mittels SDS-PAGE (3.4.2) und anschließender Silberfärbung (3.4.4) quantifiziert (10 µl iVLPs). Die iVLPs können einem Proteinase K-Verdau unterzogen oder direkt für die Infektion von HuH7-Zellen verwendet werden (Indikatorzellen).

### Proteinase K-Verdau von VLPs

Der Verdau der iVLPs durch die Proteinase K dient zum Nachweis einer spezifischen Inkorporation von Proteinen in die iVLPs. Dabei degradiert die Proteinase K alle Proteine, die nicht durch Membranen geschützt sind. Zur Aktivitätskontrolle der Proteinase K wird einem Aliquot iVLPs das Detergenz Triton X100 zugefügt, das die Permeabilisierung der iVLP-Membran und damit den Abbau sämtlicher Proteine zur Folge hat.

10 µl iVLPs + 2 µl PBS<sub>def</sub>

10 µl iVLPs + 2 µl Proteinase K (1:20 verdünnt in PBS<sub>def</sub>)

10 µl iVLPs + 2 µl Proteinase K (1:20 verdünnt in PBS<sub>def</sub> + 1%Triton)

Nach einer Stunde bei 37 °C wird die Proteinase K durch Zugabe von 1 µl PMSF (100 mM) für 5 Minuten bei RT inaktiviert. Zu jedem Ansatz werden 4 µl 4 x SDS-Probenpuffer gegeben. Die Proben werden für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert (3.4.2 und 3.4.3).

#### **Nachweis der EBOV-spezifischen Transkription in VLP-Synthesezellen**

72 h nach Transfektion werden die Zellen einmal mit PBS<sub>def</sub> gewaschen, in 1 ml PBS<sub>def</sub> mit einem Zellschaber abgekratzt und für 2 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Pellet in 200 µl Passiv-Lysispuffer des Dual-Luciferase® Reporter-Assay Systems resuspendiert und für 20 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Lysate werden anschließend zentrifugiert (13.000 Upm, 4 °C, 5 Min). Die Überstände werden in das Dual-Luciferase® Reporter-Assay System von Promega eingesetzt. Der Assay erfolgt in einem Luminometer nach Angaben des Herstellers. Man erhält einen Wert für die Renilla-Luciferase-Aktivität, die ein Maß für die EBOV-spezifische Transkription darstellt, und einen Wert für die Firefly-Luciferase-Aktivität, die der zellulären Transkription entspricht und die der Kontrolle und Normalisierung der Zelllysate dient.

#### **Infektion von HuH7-Zellen (Indikatorzellen)**

Die freigesetzten iVLPs werden nach der Ultrazentrifugation in 55 µl DMEM<sub>+Q</sub> resuspendiert und zur Infektion der HuH7-Zellen in einem finalen Volumen von 500 µl DMEM<sub>+Q</sub> pro 6 well verwendet. Nach Inkubation der iVLPs für 1 Stunde bei 37 °C erfolgt die Zugabe von 3 ml DMEM<sub>5%FCS+Q+P/S</sub> pro Ansatz und eine weitere Inkubation bei 37 °C für 60 Stunden. Es werden je nach Fragestellung naive Indikatorzellen für die Infektion verwendet, oder Zellen, die bereits einen Tag vor der Infektion mit Plasmiden für VP30 oder die entsprechende Mutante transfiziert wurden (je 500 ng Plasmid).

Zur Ernte werden die Zellen einmal mit PBS<sub>def</sub> gewaschen und in 1 ml PBS<sub>def</sub> mit einem Zellschaber abgekratzt, 2 min bei 3000 Upm zentrifugiert und schließlich in 200 µl Renilla-Lysispuffer des Renilla Luciferase Assay Systems resuspendiert.

Nach einer 20 minütigen Inkubation bei RT auf dem Schüttler erfolgt eine erneute Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wird in das Renilla-Luciferase Assay System von Promega nach Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Man ermittelt einen Wert für die Renilla-Luciferase, welche die EBOV-spezifische Primäre Transkription in den Indikatorzellen anzeigt und somit auch einen Nachweis für die Infektion der Zellen durch die iVLPs liefert.

### 3.3 VIROLOGISCHE METHODEN

Alle Arbeiten mit rekombinanten ZEBOV wurden im Hochsicherheitslabor der Stufe 4 (BSL4) am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

#### 3.3.1 REVERSE GENETIK VON REKOMBINANTEM EBOV

Die Klonierung der Volllängeplasmide erfolgt unter Verwendung des Plasmids pAMP rgZEBOV (hier recEBOV\_wt benannt) als Template. Eine GP-VP30-VP24 umfassende Genkassette wird mittels der Restriktionsendonukleasen Sall und SacI in pKAN1.1 subkloniert (3.1.8 bis 3.1.15), in dem die gewünschte Mutation per ortsgerichteter *in vitro*-Mutagenese eingefügt wird (3.1.3). Im Anschluss daran erfolgt die Rückklonierung in den Ursprungsvektor. Die einzelnen Schritte der Klonierung sind in den unter 3.1 genannten Methoden beschrieben (3.1.8 bis 3.1.15). VeroE6-Zellen (60% konfluent) werden mit Plasmiden, die für die viralen Nukleokapsidproteinen kodieren sowie den entsprechenden ZEBOV-Volllängeplasmiden transfiziert (Passage 0).

Nukleokapsidproteine:	250 ng	pCAGGS NP
	250 ng	pCAGGS VP35
	100 ng	pCAGGS VP30 bzw VP30 Mutante
	1000 ng	pCAGGS L
	250 ng	pCAGGS T7
Volllängeplasmide:	250 ng	pAMP rgZEBOV_wt
	oder 250 ng	pAMP rgZEBOV VP30_S29
	oder 250 ng	pAMP rgZEBOV VP30_S30

Die Transfektion erfolgt mit TransIT® (7 µl TransIT®/ µg DNA) nach Herstellerangaben (3.2.2). Ein Mediumwechsel zu 4 ml DMEM<sub>5%FCS+Q+P/S</sub> wird nach einem Tag durchgeführt. Sieben Tage nach Transfektion wird eine Blindpassage des Zellkulturüberstandes auf neue VeroE6-Zellen (Passage 1) durchgeführt. Zunächst erfolgt ein Mediumwechsel der Passage 1-Zellen zu 3 ml DMEM<sub>2%FCS+Q+P/S</sub>, anschließend wird 1 ml des Zellkulturüberstandes aus Passage 0 auf die Passage 1-Zellen überführt.

Nach 7-10 Tagen wird lichtmikroskopisch die Entwicklung eines zytopathischen Effekts (CPE) in Passage 1 kontrolliert.

#### 3.3.2 ANZUCHT UND KONZENTRIERUNG VON VIREN

Zur Anzucht von Viren werden VeroE6-Zellen (80 % konfluent) in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen mit je 10 ml Virusverdünnung in DMEM<sub>0%FCS+Q+P/S</sub> infiziert und 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach werden 25 ml DMEM<sub>2%FCS+Q+P/S</sub> zugegeben und die Zellen inkubiert, bis sich ein deutlicher CPE entwickelt (ca. 5-10 Tage). Der Überstand wird in 50 ml Falcon-Röhrchen in



einer Megafuge 1.0 R (Heraeus) für 10 Min bei 5000 Upm zentrifugiert. Anschließend wird die Virussuspension in 2 ml Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die Virustiter werden mittels TCID<sub>50</sub>-Analysen bestimmt (3.3.3).

Für die Ankonzentrierung des Virus wird der zellfreie Zellkulturüberstand bei 20.000 Upm für 2 Stunden über ein 20 %iges Sucrosekissen (in 1 x TNE-Puffer) ultrazentrifugiert (Rotor SW32). Zur Analyse des Phosphorylierungsstatus des VP30\_S29 wird vor der Virusaufreinigung durch Ultrazentrifugation zum Überstand 2 ml PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche) hinzugefügt (1 Tablette gelöst in 2ml dH<sub>2</sub>O, für 30 ml Virussuspension). PhosSTOP stabilisiert den Phosphorylierungsstatus von Proteinen durch die Hemmung von zellulären Phosphatasen. Das Viruspellet wird nach der Zentrifugation in 100 µl PBS<sub>def</sub> resuspendiert. Zur Virusinaktivierung werden 20 µl 4 x PP zugegeben und die Proben für 15 Minuten bei 95 °C inkubiert. Im Anschluss daran werden die inaktivierten Viren in neue Gefäße überführt und können aus dem BSL4-Labor ausgeschleust werden. Vor der Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blots werden die Proben erneut für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt.

Für die elektronenmikroskopische Analyse der Viren (3.4.5) wird das ankonzentrierte Virus mit 4 % PFA (final) versetzt, 16 h bei 4 °C inaktiviert und nach Überführung in ein neues Röhrchen ausgeschleust.

### **3.3.3 BESTIMMUNG DER VIRUSTITER: TCID<sub>50</sub>-ASSAY**

Der Virustiter wird mit Hilfe eines TCID<sub>50</sub>-Assay (*tissue culture infectious dose 50*) bestimmt. Es werden hierbei die Virusverdünnungen ermittelt, bei denen 50 % aller Zellen infiziert sind. Dazu werden VeroE6-Zellen in 96-well Zellkulturplatten (jeweils 180 µl Zellsuspension pro well) zu einer Dichte von 30-40 % kultiviert. Das Medium der ersten Reihe wird entfernt und durch 200 µl der entsprechenden Virussuspension in DMEM<sub>+Q+P/S</sub> (unverdünnt oder verdünnt) ersetzt. Es wird eine 4fach-Bestimmung der jeweiligen Proben durchgeführt sowie Mockzellen als Negativkontrolle verwendet. Mit einer Mehrkanalpipette werden anschließend jeweils 20 µl in die jeweils nächste Reihe überführt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Dabei wird vor jeder Überführung eine neue Pipettenspitze verwendet, um ungewollte Übertragungen von Viren zu vermeiden. Die Zellkulturplatten werden anschließend inkubiert, bis sich der CPE nicht mehr verändert (7-14 Tage). Die Berechnung des TCID<sub>50</sub>/ml erfolgte nach der Spearman und Kärber Methode (98).

### **3.3.4 INFEKTION MIT REKOMBINANTEM EBOLAVIRUS**

VeroE6-Zellen werden in 6-well Zellkulturplatten (ca. 10<sup>6</sup> Zellen / well) ausgesät und am nächsten Tag mit rekombinantem EBOV infiziert. Dazu wird das Medium abgenommen und durch eine EBOV-Suspension in 500 µl DMEM<sub>+Q+P/S</sub> ersetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei

37 °C wird das Inokulum entfernt und durch 3 ml DMEM<sub>2%FCS+Q+P/S</sub> ersetzt. Die Zellen werden anschließend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die eingesetzten *multiplicity of infection* (MOI) oder auch Virusverdünnungen sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

### 3.3.5 IMMUNOPLAQUE-ASSAY

Um die Morphologie von Plaques verschiedener rekombinanter Viren zu bestimmen, wird ein Immunoplaque-Assay durchgeführt. Die Infektion von VeroE6-Zellen erfolgt im 12-well Format in verschiedenen Verdünnungsstufen. Die Infektion erfolgt in einem Volumen von 200 µl DMEM<sub>+Q+P/S</sub> für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit einer MOI von 0,001. Nach der Inkubation wird das Inokulum entfernt und durch 3 ml eines 1:1 Gemisches 3 % CMC/MEM<sub>5%FCS+Q+P/S</sub> ersetzt, das durch die Viskosität der Cellulose die Ausbreitung des Virus über das Medium verhindert. So kann sich das Virus nur von Zelle zu Zelle ausbreiten und die Ausbildung einzelner Virusplaques charakterisiert werden. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank bis sich ein CPE entwickelt (4-7 Tage). Anschließend wird der Überstand abgenommen und die Zellen werden 4 x mit ca. 2 ml PBS<sub>def</sub> gewaschen. Zur Fixierung und Inaktivierung wird 4 % PFA/DMEM verwendet. Nach einer Inkubation von mindestens 16 h bei 4 °C wird das PFA durch neues 4 % PFA/PBS<sub>def</sub> ersetzt. Die Proben können nun ausgeschleust und nach einer weiteren Inkubation von mindestens 16 h bei 4 °C zur Immunfärbung verwendet werden. Die Immunfärbung erfolgt analog des Protokolls der indirekten Immunfluoreszenzanalyse nach der Fixierung (3.4.1).

## 3.4 BIOCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN

### 3.4.1 INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZANALYSE

Zur intrazellulären Lokalisation von Proteinen verwendet man die indirekte Immunfluoreszenzanalyse. Das Prinzip beruht auf zwei Antigen-Antikörper-Bindungen: Der Erstantikörper erkennt und bindet das Zielprotein in der Zelle; der Zweitantikörper ist gegen den Erstantikörper gerichtet und durch einen Fluoreszenzfarbstoff modifiziert. Durch das UV-Licht eines Fluoreszenzmikroskops wird der Farbstoff angeregt und zeigt somit die Lokalisation des Zielproteins in der Zelle an.

HuH7- oder VeroE6-Zellen werden dafür auf runden Deckgläsern (12 mm) in Zellkulturplatten kultiviert (40-50 % Konfluenz) und mit TransIT® transfiziert (3.2.3) oder mit recEBOV im BSL4-Labor infiziert (3.3.4). Zur Fixierung werden die Zellen zunächst zweimal mit 4 °C kaltem PBS<sub>def</sub> gewaschen und mit 4 % PFA/DMEM für 15 Minuten bei RT fixiert.

Bei Proben aus dem BSL4-Labor erfolgt die Fixierung der Zellen mit 4 % PFA für mindestens 16 h bei 4 °C. Danach werden die Deckgläser in neue Zellkulturplatten überführt, frisches

4 %iges PFA in PBS<sub>def</sub> zugegeben und die Proben ausgeschleust. Nach weiteren 16 h bei 4 °C können die Deckgläschen verwendet werden.

Nach der Fixierung folgt zweimaliges Waschen mit PBS<sub>def</sub> und eine Inkubation der Zellen in 100 mM Glycin (in PBS<sub>def</sub>) für 10 Minuten bei RT. Nach zwei weiteren Waschschritten werden die Zellen mit 0,1 % Triton X-100 (in PBS<sub>def</sub>) für 7 Minuten bei RT permeabilisiert. Die Zellen werden erneut gewaschen und mit Blockierungspuffer überschichtet, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Die fixierten und permeabilisierten Zellen werden mit dem ersten spezifischen Antikörper, der in Blockierungspuffer verdünnt wird, für 1 Stunde inkubiert. Dazu werden 20 µl des verdünnten Antikörpers auf Parafilm gegeben und die Deckgläser mit der zellbewachsenen Seite darauf gelegt. Anschließend werden die Deckgläser dreimal in PBS<sub>def</sub> gewaschen und für 1 Stunde mit 20 µl des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpers, wie oben beschrieben, im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS<sub>def</sub> werden die Deckgläser kurz in dH<sub>2</sub>O getaucht und mit der zellbewachsenen Seite nach unten in Fluoprep (+DABCO) auf einen Objektträger gelegt. Nach dem Trocknen der Eindeckflüssigkeit können die gefärbten Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht werden (Filter: FT460 für DAPI bzw. AMCA; FT580 für Rhodamin bzw. Alexa 593; FT510 für FITC bzw. Alexa 488). Die Detektion der Proteine erfolgt am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M (Zeiss) bei einer 63fachen Vergrößerung. Zusätzlich erfolgte die Aufnahme der Abbildung 28A, 72 h p.i. mit Hilfe des Konfokalen Laser Scanning Mikroskops (KLSM, Leica) unter Anleitung von Gordian Schudt.

Erstantikörper	Spezies	Verdünnung
$\alpha$ - <i>flag</i> <sup>TM</sup> M2, monoklonal (SIGMA-Aldrich)	Maus	1:50
$\alpha$ - HA monoclonal (Covance)	Maus	1:50
$\alpha$ - myc polyclonal (SIGMA-Aldrich)	Kaninchen	1:50
$\alpha$ - non pS29 (VP30)	Kaninchen	1:50
$\alpha$ - pS29 (VP30)	Kaninchen	1:50
$\alpha$ - VP30	Meerschweinchen	1:100
$\alpha$ - ZEBOV	Ziege	1:2000
$\alpha$ - ZEBOV NP	Huhn	1:1000
$\alpha$ - ZEBOV NP B6C5	Maus	1:20

Zweitantikörper	Spezies	Verdünnung
$\alpha$ - Maus AMCA	Pferd	1:100
$\alpha$ - Kaninchen AMCA	Pferd	1:100

$\alpha$ - Ziege	Rhodamin	Esel	1:100
$\alpha$ - Huhn	Rhodamin	Ziege	1:200
$\alpha$ - Meerschweinchen	Alexa 594	Ziege	1:200
$\alpha$ - Kaninchen	Alexa 488	Ziege	1:100
$\alpha$ - Maus	FITC	Ziege	1:100
DAPI (4',6-Diamidino-2'-Phenylindol)			1:10.000

### 3.4.2 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG (SDS-PAGE)

Proteine werden unter reduzierenden Bedingungen durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt (108). Die Proteine werden dabei mit SDS (Natriumdodecylsulfat) komplexiert und dadurch negativ geladen. Die negativen SDS-Protein-Komplexe wandern in einem Polyacrylamidgel nach Anlegen einer Spannung in Richtung Anode und trennen sich entsprechend ihrer Molekülgröße auf. Das Gel besteht aus einem 4%igen Sammelgel und, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine, einem höherprozentigen Trenngel. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden, wird ihnen eine entsprechende Menge 4x Probenpuffer (PP) zugesetzt, um die Proteine während einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 95 °C zu denaturieren. Die Gelelektrophorese erfolgt in einer Gelkammer mit 1x Proteingellaufpuffer bei 25 mA pro Gel und maximaler Spannung für ca. 45 Minuten. Anschließend erfolgt zur Analyse der Proben ein Western Blot (3.4.3).

	Sammelgel 4 %	Trenngel 12 %	15 %
dH <sub>2</sub> O	1,4 ml	1,6 ml	1,1 ml
30 % Polyacrylamid-Lösung (Rotiphorese® Gel 30)	0,33 ml	2 ml	2,5 ml
PAGE- Sammelgelpuffer	0,27 ml	-	-
PAGE- Trenngelpuffer	-	1,35 ml	1,35 ml
10 % APS	0,02 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml

### 3.4.3 ELEKTROTRANSFER VON PROTEINEN (WESTERN BLOT)

Der Western Blot ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen, die von einem SDS-Polyacrylamidgel (3.4.2) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Zur Durchführung eines Western Blots nach dem Semi-Dry-Blot-Prinzip werden 4 Blatt Whatman-Papier (7 x 9 cm) und eine Nitrocellulose-Membran (6 x 9 cm) mit Transfer-Puffer befeuchtet. Das Gel wird auf die Nitrocellulose-Membran gelegt und erneut von 4 Blatt befeuchtetem Whatmann-Papier bedeckt. Die

Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten des Blots werden durch vorsichtiges Überrollen mit einer Glaspipette entfernt. Der Transfer der Proteine erfolgt bei einer Spannung von 20 V und vollem Stromfluss von Kathode zur Anode für 40 Minuten. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wird die Membran über Nacht bei 4 °C oder für 1 Stunde bei RT in PBS<sub>def</sub> mit 10 % Magermilchpulver inkubiert. Im Anschluss wird die Membran 3 x 10 Minuten mit PBS<sub>def+0,1%Tween</sub> gewaschen und für 1 h bei RT mit einem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Ungebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen der Membran für je 10 Minuten in PBS<sub>def+0,1%Tween</sub> entfernt. Danach wird die Membran für 45 Minuten mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Membran wird anschließend 2 x 10 Minuten in PBS<sub>def+0,1%Tween</sub> und 1 x 10 Minuten in PBS<sub>def</sub> gewaschen. Die Detektion der Infrarotfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper, Alexa 680 nm (rot) und IRDye 780 nm (grün), erfolgt mit dem LiCor Odyssey Infrared Imaging System.

Alle verwendeten Antikörper / Proteine werden in PBS<sub>def+0,1% Tween+1% Magermilchpulver</sub> verdünnt.

Erstantikörper	Spezies	Verdünnung
α- flag <sup>™</sup> M2 Biotinyliert, monoklonal	Maus	1:500
α- flag <sup>™</sup> M2, monoklonal	Maus	1:500
α- HA Biotinyliert, monoklonal	Maus	1:500
α- HA polyklonal	Kaninchen	1:500
α- non pS29 (VP30)	Kaninchen	1:500
α- pS29 (VP30)	Kaninchen	1:500
α- Tubulin	Maus	1:1000
α- ZEBOV GP/NP	Ziege	1:2000
α- ZEBOV NP	Huhn	1:2000
α- ZEBOV VP30	Meerschweinchen	1:500

Zweitantikörper		Spezies	Verdünnung
α- Kaninchen	Alexa 680 nm	Ziege	1:5000
α- Maus	Alexa 680 nm	Ziege	1:5000
α- Ziege	Alexa 680 nm	Esel	1:5000
Streptavidin	Alexa 680 nm		1:5000
α- Huhn	IRDye 780 nm	Esel	1:5000
α- Kaninchen	IRDye 780 nm	Ziege	1:5000
α- Meerschweinchen	IRDye 780 nm	Ziege	1:5000

**3.4.4 SILBERFÄRBUNG VON PROTEINEN**

Mit Hilfe der Silberfärbung können Proteinen nach Separation durch SDS-PAGE direkt, d.h. ohne Transfer auf eine Membran und anschließender Antikörperinkubation, mit Silberionen unspezifisch angefärbt werden. Dies erlaubt eine schnelle Detektion von Proteinen, die für die Spezifität der Methode allerdings aufgereinigt sein sollten. Für die Quantifizierung von iVLPs vor der Infektion wurden diese per SDS-PAGE (3.4.2) separiert und anschließend mit dem PageSilver™ Silverstaining Kit (Fermentas) angefärbt. Es wurde das beiliegende Protokoll zur sensitiven Färbung durchgeführt.

**3.4.5 VORBEREITUNG VON PROBEN FÜR DIE ELEKTRONENMIKROSKOPIE (NEGATIVKONTRASTIERUNG)**

Für die Untersuchungen zur Morphologie der recEBOV wurden die Viren zunächst mittels Ultrazentrifugation über ein 20 %iges Sucrosekissen aufgereinigt und mit 4 % PFA in PBS<sub>def</sub> inaktiviert (3.3.2). Nickel-Grids werden zunächst mit einer Schicht aus 3 % Formvar in Chloroform und anschließend mit Kohlenstoff versehen. Die Beschichtung mit 20 µl der inaktivierten Viren erfolgt je nach Konzentration für 5 Minuten bis 12 Stunden. Dabei kann die Anheftung der Viruspartikel an die Grids mit einer vorigen Inkubation mit 1 % Alcyan Blau für 1 Minute verbessert werden. Nach dem Abnehmen überschüssiger Flüssigkeit mit Filterpapier, werden die Grids dreimal für 5 Minuten in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Negativkontrastierung erfolgt mit 2 % Phosphorwolframsäure (in dH<sub>2</sub>O, pH 7,2) für 2 Minuten. Überschüssige Phosphorwolframsäure wird von den Grids entfernt, die anschließend im Elektronenmikroskop analysiert werden können. Dieser Versuchsteil wurde von Dr. Larissa Kolesnikova durchgeführt.

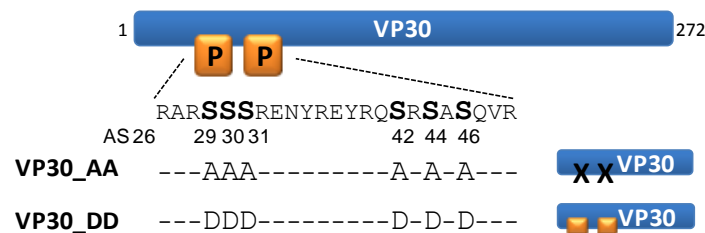
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 EINFLUSS DER PHOSPHORYLIERUNG DES VP30 AUF DEN ÜBERGANG VON VIRALER TRANSKRIPTION ZU VIRALER REPLIKATION

Das VP30 agiert als EBOV-spezifischer Transkriptionsfaktor, indem es vermutlich dem Polymerasekomplex hilft, Sekundärstrukturen am Transkriptionsstartsignal des ersten Gens zu überwinden und so die Synthese viraler mRNAs zu initialisieren (213). Die Aktivität des VP30 als Transkriptionsfaktor ist vom Phosphorylierungsstatus des Proteins abhängig: Schwach phosphoryliert oder dephosphoryliert ist VP30 transkriptionsaktiv, während ein komplett phosphoryliertes VP30 hinsichtlich der Transkription inaktiv ist. Für die virale Replikation hingegen wird VP30 nicht benötigt (144). In diesem Zusammenhang ist weder geklärt, welchen Einfluss die Phosphorylierung des VP30 auf die virale Replikation besitzt, noch durch welchen Mechanismus der Übergang von Primärer Transkription zu Replikation reguliert wird.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden zwei Mutanten des VP30 analysiert, deren phosphorylierbare Serincluster entweder zu ungeladenem Alaninresten (VP30\_AA) oder negativ geladenen Aspartatresten substituiert wurden (Abb. 8). Während VP30\_AA ein dephosphoryliertes VP30 imitiert, spiegelt VP30\_DD ein permanent phosphoryliertes VP30 wider.

Mit Hilfe dieser Phosphorylierungsmutanten sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss die Phosphorylierung des VP30 (i) auf die virale Replikation und (ii) auf die Interaktion mit den Nukleokapsidproteinen besitzt.

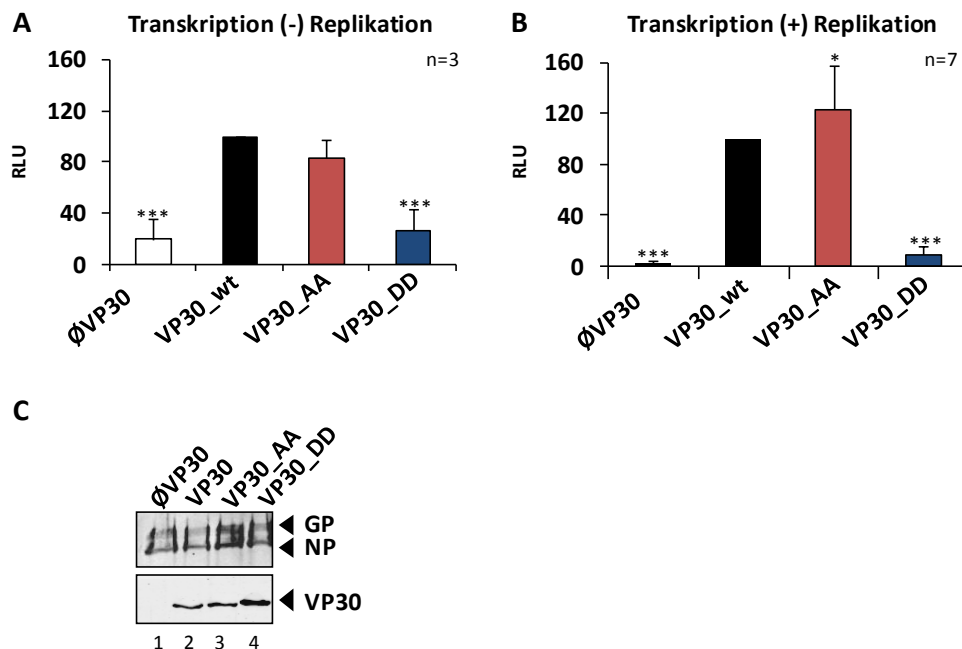


**Abbildung 8: Schematische Darstellung der VP30 Phosphorylierungsmutanten.** Die Phosphorylierung des VP30 findet an zwei N-terminal gelegenen Serinclustern statt, die durch jeweils drei Serinreste charakterisiert sind. Die verwendeten Phosphorylierungsmutanten sind durch Substitutionen der Serinreste zu ungeladenem Alanin (= dephosphoryliertes Serin) oder zu negativ geladenem Aspartat (= permanent phosphoryliertes Serin) gekennzeichnet.

#### 4.1.1 EINFLUSS DER PHOSPHORYLIERUNG DES VP30 AUF DIE VIRALE TRANSKRIPTION BEI UNTERDRÜCKTER REPLIKATION

Der Status in den iVLP-Synthesezellen (iVLP-Assay) reflektiert ein spätes Stadium der Infektion: Transkription und Replikation des Minigenoms finden parallel statt (1.6.1 und 3.2.5). Eine klare Abgrenzung zwischen beiden Prozessen ist nicht möglich, da die enkapsidierten Minigenome Templates für sowohl Transkription und als auch Replikation sind. Neu replizierte Minigenome stehen daher wieder für die Transkription zur Verfügung, so dass die parallel ablaufende Replikation das Transkriptionssignal potenziert. Von bisherigen Studien mit iVLP-Assays weiß man, dass dephosphoryliertes VP30 (imitiert durch VP30\_AA) die virale Transkription verstärkt, während vollständig phosphoryliertes VP30 (imitiert durch VP30\_DD) nicht dazu in der Lage ist (23, 128) (Abb. 9B). Möglicherweise lässt sich dieser Befund auch auf eine Verstärkung der Replikation durch dephosphoryliertes VP30 zurückführen, so dass dadurch die Anzahl der zur Verfügung stehenden Templates erhöht wird. Andererseits könnte das vollständig phosphorylierte VP30 die Replikation unterdrücken und so ebenfalls die Transkription hemmen. Inwieweit die Phosphorylierung des VP30 die virale Transkription beeinflusst, wenn keine verstärkende Replikation stattfindet, sollte daher untersucht werden. Hierzu wurde ein replikationsdefizientes EBOV-spezifisches Minigenom im iVLP-Assay verwendet (1.6.1) (85). HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.5 beschrieben transfiziert und das reguläre Minigenom durch das replikationsdefiziente Minigenom ersetzt. Abbildung 9A zeigt das Ergebnis der Reportergenaktivität in VLP-Synthesezellen. Es lässt sich erkennen, dass bei fehlender Replikation VP30\_AA, welches ein dephosphoryliertes VP30 imitiert, die Transkription induzieren konnte. VP30\_DD war unter diesen Bedingungen nicht in der Lage, die Transkription zu unterstützen. Abbildung 9B zeigt als Kontrolle die Reportergenaktivität eines regulären Minigenoms in VLP-Synthesezellen (23). Hier können replizierte Minigenome die Transkription potenzieren. Die Transkriptionsaktivität bei ausgeschalteter Replikation war in Gegenwart des inaktiven VP30\_DD und in Abwesenheit von VP30 ( $\emptyset$ VP30) höher als in Abbildung 9B. Dies lässt sich auf die insgesamt um ca. 100-fach reduzierten absoluten Messwerte zurückführen: Ohne den Zwischenschritt der Replikation steht weniger Minigenom zur Verfügung, das wiederum als Template für weitere Schritte der Transkription genutzt werden kann. Die absolute Reportergenaktivität in Anwesenheit eines aktiven VP30 war daher bei ausgeschalteter Replikation deutlich niedriger, während die absoluten Messwerte der Hintergrundaktivität gleich blieben. Dadurch relativierte sich bei prozentualer Betrachtung der Reportergenaktivität bei ausgeschalteter Replikation die Differenz zwischen inaktivem und aktivem VP30. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Dephosphorylierung des VP30 die Aktivierung der viralen Transkription auch bei unterdrückter Replikation steuerte.



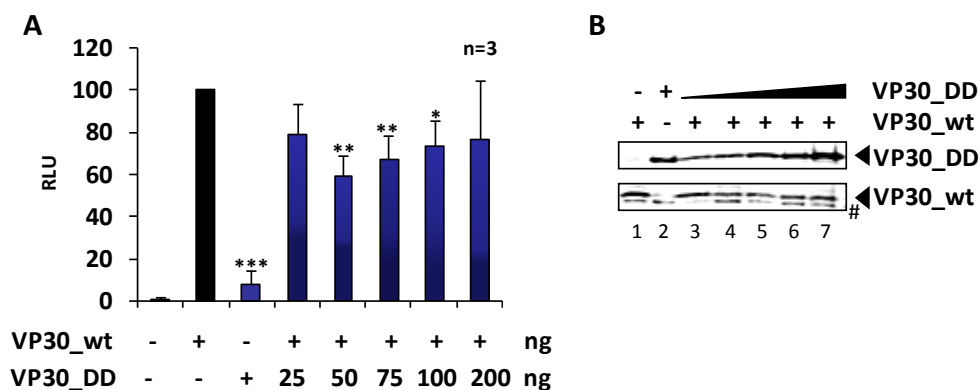


**Abbildung 9: Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die virale Transkription. A. Reporterogenaktivität der VP30 Phosphorylierungsmutanten bei unterdrückter viraler Replikation.** HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.5 beschrieben transfiziert. Dabei wurde anstelle des regulären Minigenoms ein Minigenom verwendet, das durch eine Deletion im Replikationspromotor replikationsdefizient ist. 72 h p.t. wurden die VLP-Synthesezellen lysiert und die Reporterogenaktivität ermittelt, die ein Maß für die EBOV-spezifische Transkription darstellt, die hier unabhängig von der Replikation ist. **B. Reporterogenaktivität der VP30 Phosphorylierungsmutanten unter dem Einfluss der viralen Replikation.** HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.5 beschrieben transfiziert. Es wurde das normale Minigenom verwendet, das sowohl transkribiert als auch repliziert werden kann. Die Reporterogenaktivität in den VLP-Synthesezellen steht hier unter dem Einfluss der Replikation. Dieser Versuch wurde bereits im Rahmen der eigenen Diplomarbeit durchgeführt und dient hier zum Vergleich (23). Bei beiden Versuchen wurde VP30\_wt jeweils 100 % gesetzt (RLU, *relative light units*). Statistische Relevanz zu VP30\_wt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . **C. Expression der VP30 Phosphorylierungsmutanten in VLP-Synthesezellen.** Die in A. erhaltenen Zelllysate wurden mit SDS-PAGE (12 %) und Western Blot Analyse hinsichtlich der Expression der *flag*-markierten VP30 Phosphorylierungsmutanten sowie GP und NP untersucht (3.4.2 und 3.4.3). Die Detektion der Proteine erfolgte im LiCor Odyssey nach Verwendung folgender Antikörper: monoklonaler  $\alpha$ -*flag* (Maus) und  $\alpha$ -Maus (Ziege) IRDye 780 nm für VP30 sowie  $\alpha$ -GP/NP (Ziege) und  $\alpha$ -Ziege (Esel) AlexaFluor 680 nm für GP und NP.

#### 4.1.2 EINFLUSS EINER PERMANENTEN PHOSPHORYLIERUNG DES VP30 AUF DIE VIRALE TRANSKRIPTION IN ANWESENHEIT VON VP30\_wt

VP30\_DD, welches eine permanente Phosphorylierung des VP30 imitiert, besitzt eine inhibitorische Wirkung auf die Initialisierung der viralen Transkription. Es sollte nun untersucht werden, ob VP30\_DD einen dominant-negativen Phänotyp besitzt. Dazu wurde VP30\_DD in Anwesenheit von VP30\_wt im Kontext eines iVLP-Assays titriert (3.2.5). Abbildung 10A zeigt das Ergebnis der gemessenen Reporterogenaktivität in VLP-Synthesezellen. Die Reporterogenaktivität war bei gleichzeitiger Anwesenheit von VP30\_DD und VP30\_wt reduziert, allerdings im Gegensatz zur alleinigen Präsenz von VP30\_DD noch deutlich nachweisbar (zwischen 60 und 80 % Aktivität). Die Inhibition der Reporterogenaktivität zeigte sich erst ab einer zusätzlichen exprimierten Menge von 50 ng VP30\_DD. Waren VP30\_wt und VP30\_DD in

gleichen Mengen vorhanden (jeweils 100 ng), lag die Reporterogenaktivität wieder bei 75 %. Die dominant-negative Wirkung des VP30\_DD war demnach nicht konzentrationsabhängig. Bei höheren Konzentrationen an VP30\_DD war der inhibitorische Effekt nicht mehr statistisch signifikant. Möglicherweise spielt hier nicht nur das Mengenverhältnis von VP30\_wt zu VP30\_DD sondern auch die Wechselwirkung von VP30\_wt und/oder VP30\_DD mit den anderen Nukleokapsidproteinen eine wichtige Rolle, die die Reporterogenaktivität beeinflusst. Dies wurde bereits in früheren Versuchen beobachtet. Die Expression von VP30\_DD und VP30\_wt wurde mittels Western Blots überprüft (3.4.2 und 3.4.3) (Abb. 10B).



**Abbildung 10: Inhibitorischer Einfluss des VP30\_DD auf die virale Transkription in Anwesenheit von VP30\_wt.**

**A. Reporterogenaktivität in VLP-Synthesezellen.** HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.5 beschrieben transfiziert. Dabei wurde in Anwesenheit von VP30\_wt (100 ng) die Menge an VP30\_DD titriert (25 - 200 ng). 72 h p.t. wurden die Zellen lysiert und die Reporterogenaktivität ermittelt. Die Reporterogenaktivität (RLU, *relative light units*) von VP30\_wt wurde 100 % gesetzt. Statistische Relevanz zu VP30\_wt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

**B. Expression von VP30\_wt und VP30\_DD in VLP-Synthesezellen.** Die in A. erhaltenen Zelllysate wurden mit SDS-PAGE (12 %) und Western Blot Analyse hinsichtlich der Expression des *myc*-markierten VP30\_wt und des *flag*-markierten VP30\_DD untersucht (3.4.2 und 3.4.3). Die Detektion der Proteine erfolgte im LiCor Odyssey nach Verwendung folgender Antikörper:  $\alpha$ -*myc* (Kaninchen) und  $\alpha$ -Kaninchen (Ziege) IRDye 780 nm für VP30\_wt sowie ein monoklonaler biotinylierter  $\alpha$ -*flag* Antikörper (Maus) und Streptavidin AlexaFluor 680 nm für VP30\_DD. # Unspezifische Bande.

#### 4.1.3 EINFLUSS DER PHOSPHORYLIERUNG DES VP30 AUF DIE VIRALE REPLIKATION

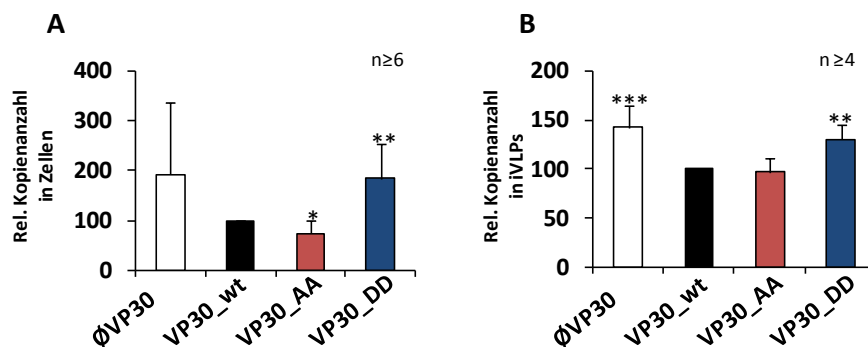
Wie bereits weiter oben erwähnt, ist bisher nicht geklärt, ob virale Transkription und Replikation von dem gleichen Syntheseapparat katalysiert werden und deshalb zueinander in Konkurrenz stehen, oder ob es sich um voneinander unabhängige Prozesse handelt. Wenn Transkription und Replikation um das Template konkurrieren, würde in Gegenwart ausreichender Mengen viraler Proteine ein Abschalten der Transkription die Replikation favorisieren. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Gegenwart von VP30\_DD die virale Replikation beeinflusst. Wenn die Phosphorylierung des VP30 die virale Transkription inhibiert, sollte die Replikation unter diesen Bedingungen favorisiert sein, hingegen könnte dephosphoryliertes VP30 einen negativen Einfluss auf die Replikation besitzen. Dazu sollte als

Maß für virale Replikation die Kopienanzahl von Minigenomen in den VLP-Synthesezellen sowie in iVLPs mittels quantitativer RealTime-PCR bestimmt werden (3.1.5). Es wurde durch die Verwendung eines Strang-spezifischen Primers gewährleistet, dass während der Reversen Transkription nur repliziertes Minigenom (vRNA) als Template verwendet wird, so dass weder das positivsträngige Intermediat der Replikation, noch die virale mRNA berücksichtigt wurden. Die so generierte cDNA (= repliziertes Minigenom) wurde mittels PCR amplifiziert und quantitativ ausgewertet. Zur Erhöhung der Spezifität wurde diese von Hoenen et al. publizierte Methode erweitert und in der PCR eine sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonde verwendet (85).

HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.5 beschrieben transfiziert und VP30\_wt durch die Phosphorylierungsmutanten VP30\_AA und VP30\_DD ersetzt. Um die Menge an iVLPs und damit auch Minigenom-RNA in den iVLPs zu erhöhen, wurde ein dreifacher Ansatz transfiziert (3 wells / 6 well-Zellkulturplatte). Die VLP-Synthesezellen wurden 72 h p.t. geerntet: 1/3 des Zelllysats wurde zur Aufreinigung und Isolierung der RNA (3.1.6) und 1/3 zur Bestimmung der Reportergenaktivität verwendet (3.2.5). Die Aktivität der Firefly-Luciferase (Transfektionskontrolle) wurde ermittelt und diente der Normalisierung der RNA-Proben. Die RNA wurde nach einem DNaseI-Verdau in cDNA umgeschrieben und im Anschluss per RealTime-PCR quantifiziert (3.1.5). Dabei wurden die für VP30\_wt ermittelten replizierten Minigenomkopien 100 % gesetzt. Abbildung 11A zeigt die virale Replikation in VLP-Synthesezellen. Die virale Replikation ohne VP30 ( $\emptyset$ VP30) war erhöht (190 %), allerdings zeigten sich hier statistische Schwankungen. Im Vergleich mit VP30\_wt wurde deutlich, dass die virale Replikation in den VLP-Synthesezellen mit VP30\_AA ( $\triangleq$  dephosphoryliertes VP30) reduziert war. Die Menge an repliziertem Minigenom in Anwesenheit eines permanent negativ geladenen VP30\_DD ( $\triangleq$  permanent phosphoryliertes VP30) war hingegen verstärkt. Die Phosphorylierung des VP30 besaß also einen positiven Einfluss auf die virale Replikation in VLP-Synthesezellen.

Zusätzlich sollte die Menge des in iVLPs inkorporierten Minigenoms quantifiziert werden und die Frage geklärt werden, ob entsprechend der verstärkten Replikation auch mehr Minigenom in iVLPs eingebaut wird, wenn VP30 vollständig phosphoryliert ist (VP30\_DD). Dazu wurde der Überstand der transfizierten VLP-Synthesezellen gesammelt und die iVLPs mittels Ultrazentrifugation pelletiert (3.2.5). Es erfolgte die Aufreinigung der RNA aus den präzipitierten iVLPs wie unter 3.1.6 beschrieben. Ein Aliquot der iVLPs wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot (3.4.2 und 3.4.3) hinsichtlich der Proteinmenge von VP40 analysiert. Die Menge an VP40 in den iVLPs diente als Marker für die Menge an freigesetzten iVLPs und wurde zur Normalisierung der in die PCR eingesetzten RNA verwendet. Im Anschluss erfolgte die

Reverse Transkription und RealTime-PCR (3.1.5). Die ermittelte Anzahl an Minigenomkopien in Anwesenheit von VP30\_wt wurde 100 % gesetzt. In Gegenwart von VP30\_DD wurde mehr repliziertes Minigenom in die iVLPs inkorporiert (Abb. 11B). Ebenso befand sich ohne VP30 (ØVP30) mehr repliziertes Minigenom in den iVLPs. Die Menge replizierter Minigenomkopien unterschied sich nicht in den Ansätzen mit entweder VP30\_AA oder VP30\_wt. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass die Menge an Minigenomkopien in den iVLPs nicht ausreichend war, um einen geringen inhibitorischen Effekt des VP30\_AA im Vergleich zu VP30\_wt nachzuweisen.



**Abbildung 11: Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die virale Replikation. A. Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die virale Replikation in VLP-Synthesezellen.** HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.5 beschrieben transfiziert und dabei VP30\_wt durch die Phosphorylierungsmutanten substituiert. 72 h p.t. wurden die VLP-Synthesezellen lysiert und die RNA isoliert (3.1.6). Zusätzlich wurde ein weiteres Aliquot der VLP-Synthesezellen zur Bestimmung der Reportergenaktivität der Firefly-Luciferase (Transfektionskontrolle) verwendet, die zur Normalisierung der RNA-Proben diente. Die RNA wurde nach einem DpnI-Verdau mit einem für repliziertes Minigenom spezifischen Primer revers transkribiert. Anschließend wurde die Anzahl der replizierten Minigenomkopien durch Verwendung einer sequenzspezifischen Sonde quantitativ per RealTime-PCR ermittelt (3.1.5). **B. Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die Inkorporation replizierter Minigenome in iVLPs.** Die in den Überstand freigesetzten iVLPs wurden wie unter 3.2.5 beschrieben aufgereinigt und deren RNA isoliert. Ein Aliquot der iVLPs wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse (3.4.2 und 3.4.3) hinsichtlich der VP40 Expression analysiert. Diese dient als Maß für die Menge an freigesetzten iVLPs und wurde zur Normalisierung der RNA verwendet. Im Anschluss erfolgte wie unter A. beschrieben die quantitative Analyse der replizierten Minigenomkopien per RT- und RealTime-PCR (3.1.5).

Die Anzahl der replizierten Minigenomkopien in Anwesenheit des VP30\_wt wurde jeweils 100 % gesetzt. Statistische Relevanz zu VP30\_wt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Die Phosphorylierung des VP30 beeinflusste sowohl virale Transkription als auch virale Replikation. War VP30 komplett dephosphoryliert (imitiert durch VP30\_AA), wurde die Transkription induziert, während die Replikation reduziert war. Genau umgekehrt verhielt es sich, wenn VP30 eine statische negative Ladung an der Phosphorylierungsstelle trug, die den permanent phosphorylierten Zustand des VP30 imitiert (VP30\_DD). Unter diesen Bedingungen fand vermehrt Replikation statt, hingegen war die Aktivierung der Transkription stark reduziert. Der Einfluss statischer Ladungen an der VP30 Phosphorylierungsstelle auf die Replikation war allerdings nicht ganz so deutlich wie bei der Aktivierung der viralen Transkription. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung des VP30 einen

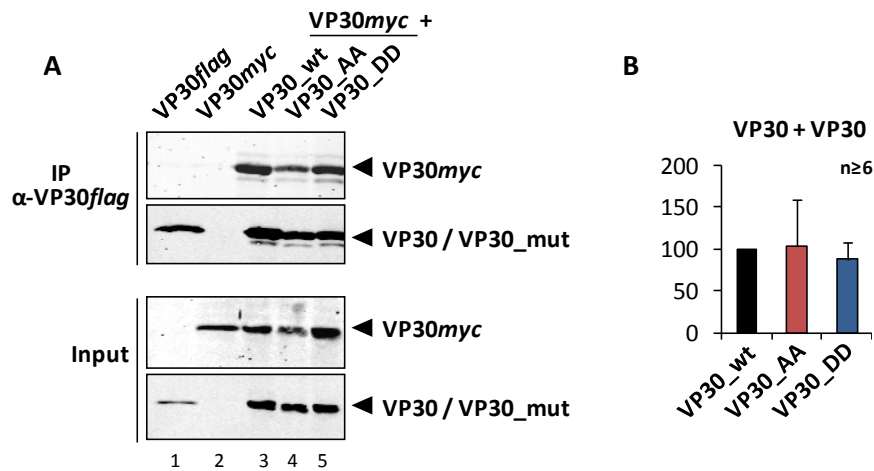
regulierenden Einfluss auf den Übergang von viraler Transkription zu viraler Replikation besitzt. Es ist vorstellbar, dass die statische Ladung des VP30 dazu beiträgt, einen möglichen Transkriptionskomplex irreversibel zu einem Replikationskomplex zu modifizieren, oder auch dass beide Komplexe um das Template konkurrieren.

#### 4.1.4 EINFLUSS DER PHOSPHORYLIERUNG AUF DIE HOMOOLOGOMERISIERUNG DES VP30

Die Replikation von EBOV wurde durch die Phosphorylierung des VP30 beeinflusst, allerdings ist der Mechanismus bisher unklar. Ausgehend von der Hypothese, dass sich die Zusammensetzung des viralen RNA-Synthesekomplexes durch die Phosphorylierung des VP30 ändern könnte und dadurch ein Transkriptions- bzw. Replikationskomplex entsteht, galt es zu untersuchen, inwieweit die Phosphorylierung von VP30 möglicherweise die Interaktion mit den einzelnen Nukleokapsidproteinen beeinflusst. In diesem Zusammenhang sollte die Interaktion der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit einem *wildtypischen* VP30, mit NP sowie VP35 untersucht werden. Untersuchungen zur Interaktion von VP30 mit der Polymerase L waren nicht möglich. Trotz Verwendung unterschiedlicher Epitop-markierter L-Konstrukte ließ sich keine Expression von L im Western Blot nachweisen (3.4.3).

VP30 oligomerisiert über ein basisches Cluster im C-Terminus zu Dimeren, die sich über ein Leucincluster im N-Terminus zu Hexameren zusammenlagern (77, 78). Transkriptionsaktiv ist nur die hexamere Form des VP30. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, inwieweit die Phosphorylierung des VP30 N-Terminus die Ausbildung transkriptionsaktiver VP30 Hexamere in Anwesenheit eines *wildtypischen* VP30 beeinflusst.

Dazu wurden die *flag*-Epitop markierten VP30 Phosphorylierungsmutanten mit einem *myc*-Epitop markierten VP30\_wt co-exprimiert und mittels einer anti-*flag* Agarose präzipitiert (3.2.4). Die Expression aller Konstrukte im Zelllysate wurde überprüft und zur Normalisierung der Präzipitation verwendet (Abb. 13A, Input). Abbildung 13A zeigt das Ergebnis einer Co-Immunpräzipitation. Es lässt sich erkennen, dass VP30\_AA und VP30\_DD ähnlich wie VP30\_wt in der Lage waren, *myc*-markiertes *wildtypisches* VP30 zu präzipitieren (Abb. 13A, IP Spuren 3-5). Als Kontrolle diente einzeln exprimiertes *myc*-markiertes VP30\_wt, welches nicht unspezifisch durch die anti-*flag* Agarose präzipitiert wurde (Abb. 13A, Spur 2). Abbildung 13B zeigt die Quantifizierung von mindestens sechs unabhängigen Experimenten; die Präzipitation von *myc*-markiertem VP30\_wt durch *flag*-markiertes VP30\_wt wurde 100% gesetzt. Es zeigte sich, dass der Phosphorylierungsstatus keinen signifikanten Einfluss auf die Homooligomerisierung des VP30 hatte. Sowohl VP30\_AA als auch VP30\_DD präzipitierten *myc*-markiertes VP30\_wt genauso gut wie VP30\_wt.



**Abbildung 12: Einfluss der VP30 Phosphorylierungsmutanten auf die Homooligomerisierung mit VP30\_wt.**

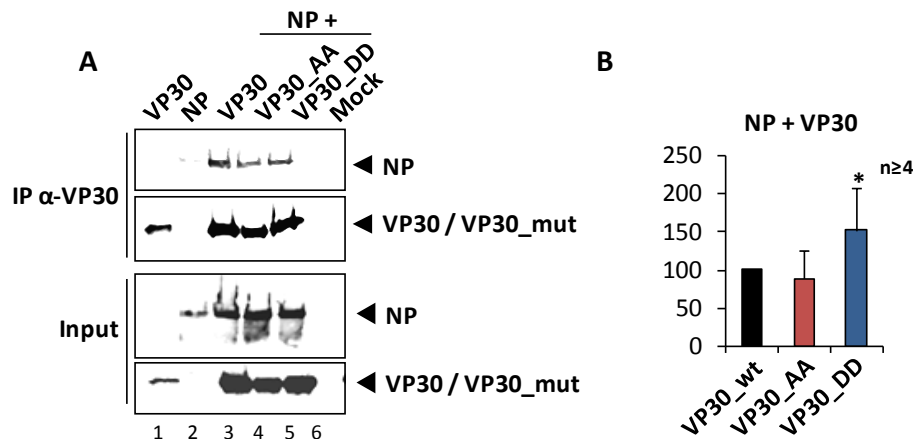
**A. Co-Immunpräzipitationsanalyse der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit VP30\_wt.** HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.5 beschrieben transfiziert. 48 h p.t. erfolgte die Lyse und Co-Immunpräzipitation der *flag*-markierten VP30 Phosphorylierungsmutanten mit  $\alpha$ -*flag* Agarose. Im Anschluss wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (12 %) und Western Blot separiert (3.4.2 und 3.4.3). Zusätzlich wurde die Expression aller Konstrukte vor der Präzipitation überprüft (Input). Die Co-Präzipitation eines *myc*-markierten VP30\_wt wurde mit einem  $\alpha$ -*myc* (Kaninchen) und einem  $\alpha$ -Kaninchen IRDye 780 nm (Ziege) nachgewiesen, die Präzipitation der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit einem monoklonalen biotinylierten  $\alpha$ -*flag* (Maus) und Streptavidin Alexa 680 nm Antikörper. **B. Quantitative Auswertung der Co-Immunpräzipitationsanalyse.** Die Präzipitation von *myc*-markiertem VP30\_wt durch *flag*-markiertes VP30\_wt wurde 100 % gesetzt. Außerdem erfolgte eine Normalisierung der Präzipitate hinsichtlich des Inputs. Statistische Relevanz zu VP30\_wt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

#### 4.1.5 EINFLUSS DER PHOSPHORYLIERUNG DES VP30 AUF DIE INTERAKTION MIT NP

In Immunfluoreszenzanalysen konnte bereits gezeigt werden, dass in Gegenwart von NP die intrazelluläre Verteilung des VP30 durch dessen Phosphorylierungsstatus beeinflusst wird: so findet sich phosphoryliertes VP30 (VP30\_DD) in NP-induzierten *inclusion bodies*, während dephosphoryliertes VP30 (VP30\_AA) in diesen Einschlusskörpern nicht konzentriert wird, sondern diffus im Zytoplasma verteilt bleibt (128, 137, 139). Die Inkorporation von VP30 in iVLPs wird über die Interaktion mit NP vermittelt und findet dennoch unabhängig vom Phosphorylierungsstatus des VP30 statt: so wird auch VP30\_AA ( $\triangleq$  dephosphoryliertes VP30) in iVLPs eingebaut (23, 128).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Interaktion der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit NP in Co-Immunpräzipitationsstudien quantifiziert werden (3.2.4). Dazu wurden *flag*-Epitop markierte VP30 Phosphorylierungsmutanten zusammen mit NP in HEK293-Zellen rekombinant exprimiert, und 48 h später und die Proteinkomplexe mittels anti-*flag* Agarose präzipitiert (3.2.2). Die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgte nach SDS-PAGE und Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern (3.4.2 und 3.4.3). VP30\_wt sowie beide Phosphorylierungsmutanten VP30\_AA und VP30\_DD waren in der Lage, NP präzipitieren (Abb. 12A, IP Spur 3-5). Die Expression aller Konstrukte wurde überprüft (Abb. 12A, Input 1-5) und zur Normalisierung der präzipitierten Proteine verwendet. Abbildung 12B zeigt die

Quantifizierung von mindestens vier unabhängigen Experimenten. Die Interaktion von NP mit VP30\_wt wurde dabei 100% gesetzt. Es zeigte sich, dass VP30\_AA ( $\triangleq$  dephosphoryliertes VP30) ähnlich wie VP30\_wt in der Lage war, NP zu präzipitieren, während phosphomimetisches VP30\_DD besser (ca. 150 %) mit NP interagieren konnte.

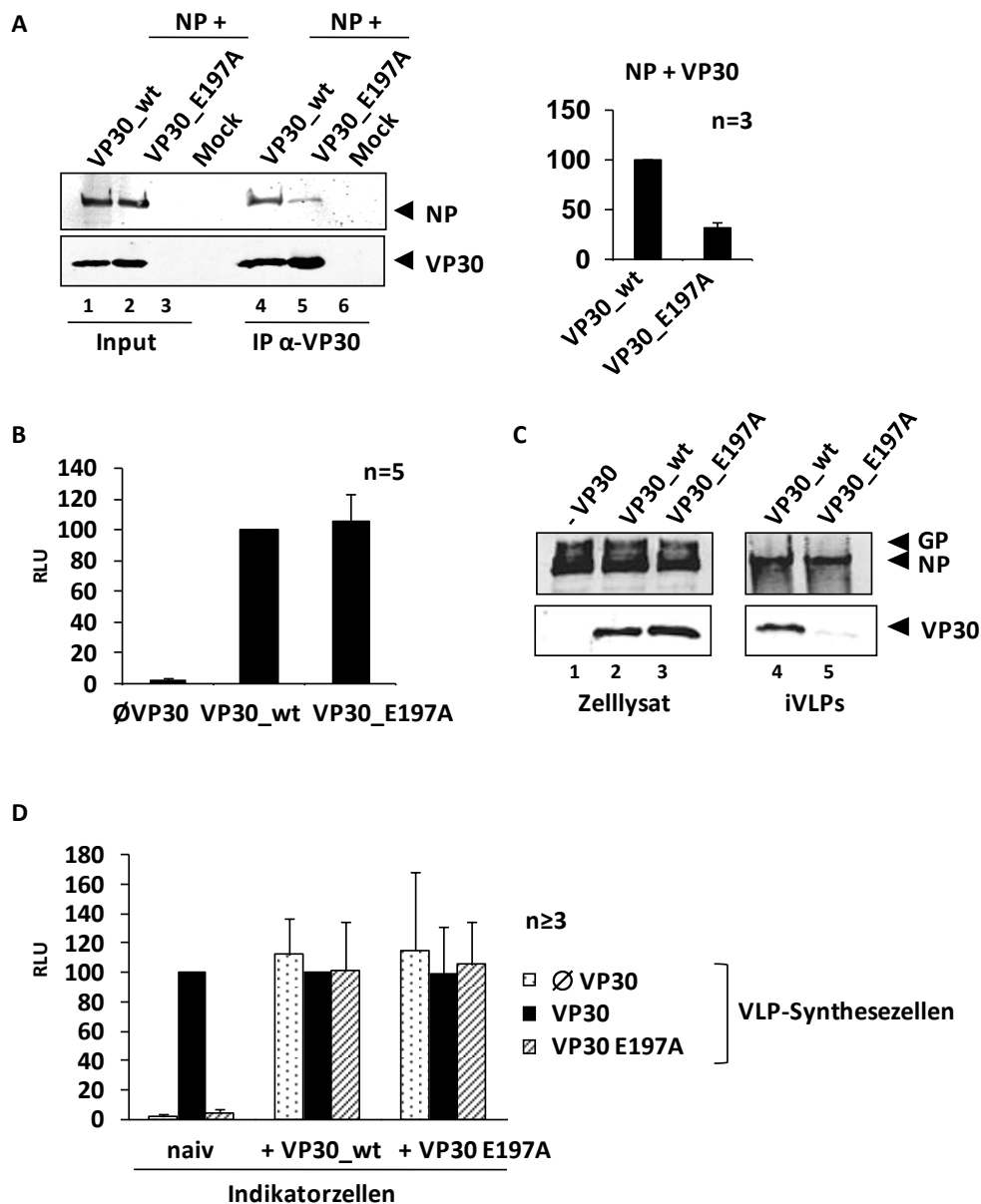


**Abbildung 13: Interaktion der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit NP.** A. Co-Immunpräzipitationsanalyse der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit NP. HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert. 48 h p.t. erfolgte die Lyse und Immunpräzipitation der *flag*-markierten VP30 Phosphorylierungsmutanten mit  $\alpha$ -*flag* Agarose. Im Anschluss wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (12 %) und Western Blot (3.4.2 und 3.4.3) separiert. Zusätzlich wurde die Expression aller Konstrukte vor der Präzipitation überprüft (Input). Die Co-Präzipitation des NP wurde mit  $\alpha$ -NP (Huhn) und  $\alpha$ -Huhn Alexa 680 nm nachgewiesen, die Präzipitation der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit einem monoklonalen biotinylierten  $\alpha$ -*flag* (Maus) und Streptavidin Alexa 680 nm Antikörper. B. Quantitative Auswertung der Co-Immunpräzipitationsanalyse. Die Präzipitation von NP durch VP30\_wt wurde 100 % gesetzt. Außerdem erfolgte eine Normalisierung der Präzipitate hinsichtlich des Inputs. Statistische Relevanz zu VP30\_wt: \* p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01; \*\*\* p  $\leq$  0,001.

#### 4.1.6 EINFLUSS DER VP30-NP INTERAKTION AUF DIE VIRALE TRANSKRIPTION

Die Phosphorylierung des VP30 (imitiert durch die negative Ladung des VP30\_DD) begünstigte die Interaktion mit NP, dennoch ist phosphoryliertes VP30 trotz stärkerer Interaktion mit NP nicht in der Lage, die virale Transkription zu induzieren. Die Bindungsaffinität des VP30 an NP scheint also nicht für die Transkriptionsaktivierung durch VP30 ausschlaggebend zu sein. Mit Hilfe der Kristallstruktur des VP30 C-Terminus wurden bereits in früheren Studien basische Aminosäuren identifiziert, die die Interaktion des VP30 mit NP beeinflussten (Basisches Cluster AS R179/K180/K183 sowie AS D158/E197) (78). In diesem Zusammenhang wurde eine VP30-Mutante mit Punktmutation an Position E197 von Glutamat zu Alanin generiert. Mit Hilfe dieser VP30-Mutante sollte nun untersucht werden, ob der Aminosäureaustausch E197A für die Interaktion mit NP essentiell ist und welche Auswirkungen eine fehlende Interaktion beider Proteine auf den viralen Replikationszyklus besitzt. Zunächst wurde die Interaktion von VP30\_E197A mit NP in der Co-Immunpräzipitation überprüft (3.2.4). Abbildung 14A zeigt das Ergebnis einer Co-Immunpräzipitation sowie der Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Substitution des Glutamats zu Alanin

an Position 197 einen direkten Einfluss auf die Interaktion mit NP besaß: Im Vergleich zu VP30\_wt war die Interaktion von VP30\_E197A mit NP deutlich reduziert (32%). Mit Hilfe dieser NP-bindungsdefizienten Mutante VP30\_E197A sollte nun untersucht werden, ob die Transkriptionsaktivierung von VP30 durch die schwächere NP-Interaktion beeinflusst wird. Dazu wurde im Rahmen eines iVLP-Assays VP30\_wt durch VP30\_E197A ersetzt (3.2.5). Es zeigte sich, dass VP30\_E197A die virale Transkription in den VLP-Synthesezellen sogar etwas besser aktivieren konnte als VP30\_wt (Abb. 14B). Die direkte Interaktion von VP30 und NP scheint also für die Transkriptionsaktivierung durch VP30 nicht essentiell zu sein. Als nächstes wurde die Inkorporation des VP30\_E197A in iVLPs untersucht. Die in den Überstand freigesetzten iVLPs wurden dazu einem Proteinase K-Verdau unterzogen.





**Abbildung 14: Die Bedeutung der VP30-NP Interaktion für die virale Transkription. A. Co-Immunpräzipitationsanalyse von VP30 mit NP.** HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert. 24 h p.t. erfolgte die Lyse und Immunpräzipitation der *flag*-markierten VP30 Phosphorylierungsmutanten mit  $\alpha$ -*flag* Agarose. Im Anschluss wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (12 %) und Western Blot) separiert (3.4.2 und 3.4.3). Zusätzlich wurde die Expression aller Konstrukte vor der Präzipitation überprüft (Input). Die Co-Präzipitation des *myc*-markierten NP wurde mit  $\alpha$ -*myc* (Kaninchen) und  $\alpha$ -Kaninchen IRDye 780 nm nachgewiesen, die Präzipitation der VP30 Mutanten mit einem monoklonalen biotinylierten  $\alpha$ -*flag* (Maus) und Streptavidin Alexa 680 nm Antikörper. Die Präzipitation von NP durch VP30\_wt wurde 100 % gesetzt. Außerdem erfolgte eine Normalisierung der Präzipitate hinsichtlich des Inputs. Statistische Relevanz zu VP30\_wt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . **B. Reporterogenaktivität in VLP-Synthesezellen.** HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.5 beschrieben transfiziert und VP30\_wt durch VP30\_E197A ersetzt, das nicht mehr in der Lage ist, mit NP zu interagieren. 72 h p.t. wurden die Zellen lysiert und die Reporterogenaktivität (RLU, *relative light units*) ermittelt. Die Reporterogenaktivität von VP30\_wt wurde 100 % gesetzt. **C. Expression des VP30 und Inkorporation in iVLPs.** Die in B. erhaltenen Zelllysate wurden mit SDS-PAGE (12%) und Western Blot Analyse hinsichtlich der Expression der *flag*-markierten VP30 Mutanten untersucht (3.4.2 und 3.4.3). Außerdem wurde nach Ankonzentrierung der iVLPs die Inkorporation des VP30 in die iVLPs durch einen Proteinase K-Verdau überprüft (3.2.5). Die Inkorporation des VP30 wurde mittels  $\alpha$ -*flag* (Maus) und  $\alpha$ -Maus (Ziege) Alexa 680 nm Antikörpern nachgewiesen. Zur Kontrolle sind GP und NP durch einen  $\alpha$ -GP/NP Antikörper (Ziege) und einen  $\alpha$ -Ziege (Esel) Alexa 680 nm Antikörper gefärbt. **D. Reporterogenaktivität in Indikatorzellen.** Nach Freisetzung der iVLPs in den Überstand wurden diese wie unter 3.2.5 beschrieben ankonzentriert und zur Infektion der Indikatorzellen verwendet. Diese wurden zuvor mit Plasmiden, die für VP30\_wt oder VP30\_E197A kodieren, transfiziert oder untransfiziert verwendet (naiv). 60 h p.i. erfolgte die Lyse der Zellen und die Bestimmung der Reporterogenaktivität. Diese stellt in den naiven Indikatorzellen ein Maß für die primäre virale Transkription dar, da alle viralen Nukleokapsidproteine inkorporiert und in den Indikatorzellen zur Verfügung stehen müssen. Die Reporterogenaktivität von VP30\_wt wurde 100 % gesetzt. Statistische Relevanz zu VP30\_wt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Alle nicht von Membranen geschützten Proteine werden dabei abgebaut, nur spezifisch in die iVLPs inkorporierte Proteine werden so nachgewiesen. Es lässt sich erkennen, dass zwar VP30\_wt, jedoch kein VP30\_E197A in die iVLPs inkorporiert wurde (Abb. 14C, Spur 5 und 6). Die Interaktion von VP30 und NP ist demnach essentiell für die Inkorporation des VP30 in iVLPs. In einem weiteren Versuch wurde näher untersucht, inwieweit die Transkriptionsaktivierung in Indikatorzellen durch die fehlende Interaktion beider Proteine beeinflusst wird (Abb. 14D). Dazu wurden die generierten iVLPs zur Infektion von Indikatorzellen verwendet, die nach voriger Transfektion entweder VP30\_wt oder VP30\_E197A *in trans* exprimierten. Außerdem wurden nicht-transfizierte (naive) Indikatorzellen mit den hergestellten iVLPs infiziert. War VP30\_E197A in den ursprünglichen VLP-Synthesezellen vorhanden, ließ sich keine Reporterogenaktivität in den naiven Indikatorzellen detektieren, was sich auf die mangelnde Inkorporation des VP30\_E197A in die iVLPs zurückführen lässt. Durch die Bereitstellung von VP30\_wt *in trans* in den Indikatorzellen sollte das inkorporierte Minigenom-Template hinsichtlich seiner Funktion untersucht werden. In Anwesenheit von VP30\_wt *in trans* konnte die Transkription des Minigenoms bei Abwesenheit von VP30 in den iVLPs (ØVP30 bzw. VP30\_E197A) komplett wiederhergestellt werden. Ebenso konnte *in trans* bereitgestelltes VP30\_E197A die Transkription in den Indikatorzellen wieder aktivieren. Das Minigenom war also in seiner Templatefunktion trotz der fehlenden VP30-NP Interaktion in den VLP-Synthesezellen nicht beeinträchtigt. Außerdem weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Replikation in den VLP-Synthesezellen von der fehlenden Interaktion zwischen NP und

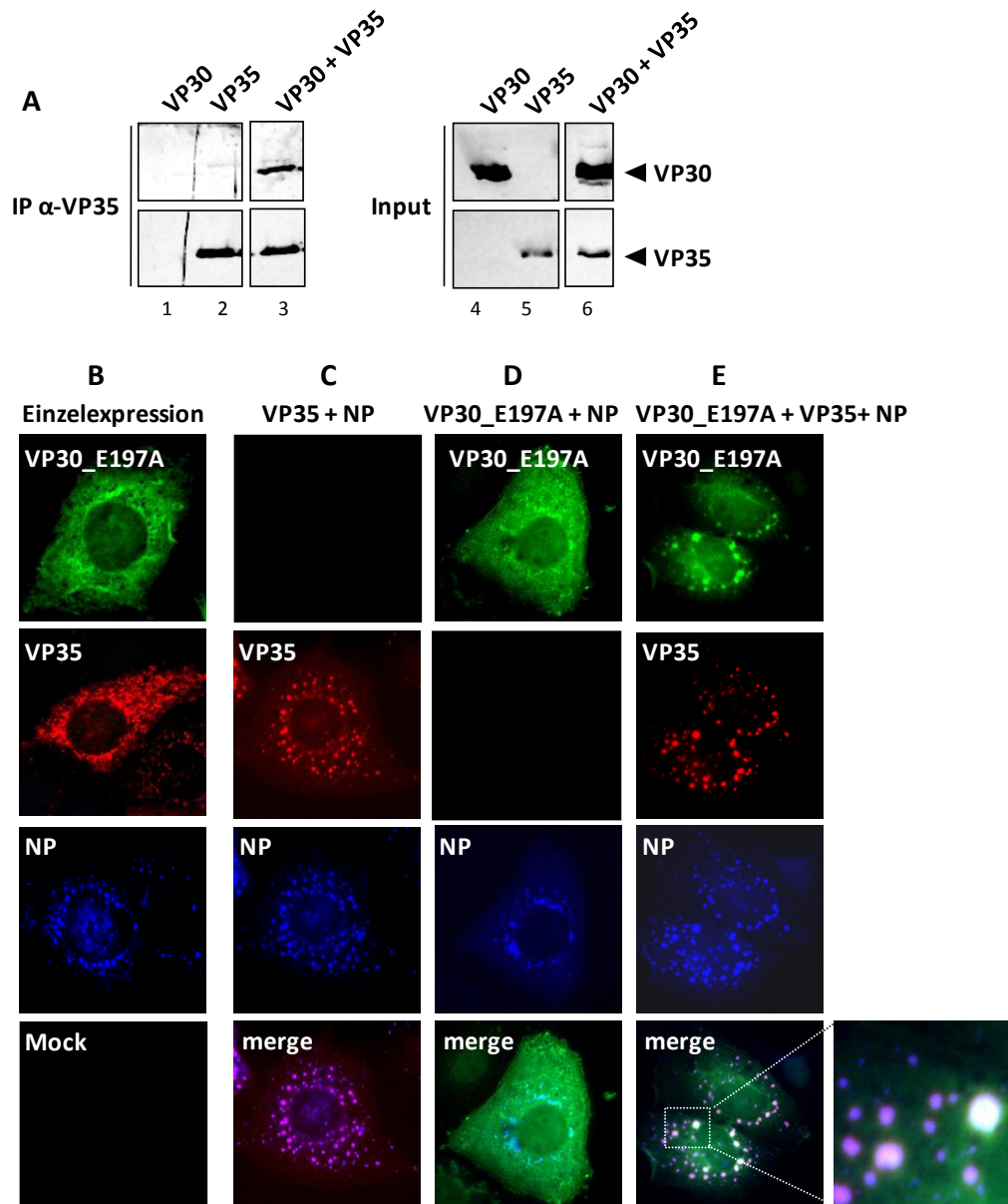
VP30 nicht beeinflusst wurde. Würde sich die fehlende VP30-NP Interaktion negativ auf die virale Replikation ausüben, stünde folglich auch weniger Minigenom zur Transkription in den Indikatorzellen zur Verfügung. Da es allerdings keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Reportersignals gab, scheint sich die Menge an inkorporiertem Minigenom bei fehlender VP30-NP Interaktion nicht von den *Wildtyp*-Bedingungen zu unterscheiden.

Die hier gewonnenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Interaktion von VP30 und NP für die virale Transkriptionsaktivierung nicht benötigt wird. Wohl aber spielt die Interaktion eine bedeutende Rolle für die Inkorporation des VP30 in iVLPs: VP30 wird NP-abhängig in die iVLPs rekrutiert, was für die Initiation der Primären Transkription in Indikatorzellen essentiell ist.

#### 4.1.7 DIE INTERAKTION DES VP30 MIT VP35

Um weitere Erkenntnisse hinsichtlich eines Mechanismus der phosphorylierungsabhängigen Regulation der Transkription durch VP30 zu gewinnen, wurde als nächstes die Interaktion des VP30 mit einem weiteren Nukleokapsidprotein, dem Polymerase Co-Faktor VP35, überprüft.

Während das P-Protein anderer Vertreter der *Mononegavirales* ein klassisches Phosphoprotein darstellt, ist das funktionelle Homolog des P-Proteins bei Filoviren, VP35, kaum phosphoryliert (60, 111, 142). Bisher ist nicht bekannt, inwieweit das VP30 möglicherweise Funktionen des VP35 übernimmt und ob beide Nukleokapsidproteine miteinander interagieren. Daher war es interessant zu überprüfen, ob sich eine direkte Interaktion von VP30 und VP35 nachweisen lässt. Es wurde zunächst eine Co-Immunpräzipitationsanalyse mit HA-Epitop markiertem VP35 und *flag*-markiertem VP30 durchgeführt. Die Präzipitation erfolgte unter Verwendung einer anti-HA Agarose (3.2.4). Nach Co-Expression beider Proteine zeigte sich, dass VP30 durch VP35 präzipitiert wurde (Abb. 15A, Spur 3). Dabei diente als Kontrolle einzelexprimiertes VP30, welches nicht durch die anti-HA Agarose präzipitiert wurde (Abb. 15A, Spur 1). Die Analyse der Zellysate (Input) bestätigte die Expression aller Proteine (Abb. 15A, Spur 4-6). Um das Ergebnis mit einer weiteren Methode zu verifizieren, wurde außerdem eine Immunfluoreszenzstudie durchgeführt (3.4.1). Sowohl VP30 als auch VP35 waren nach Einzelexpression diffus im Zytoplasma verteilt, daher wäre eine mögliche Co-Lokalisation bei Co-Expression beider Proteine nur schwer zu interpretieren (Abb. 15B). Es wurde deshalb nach einer Alternative gesucht, die Interaktion von VP30 und VP35 in der Immunfluoreszenzanalyse zu untersuchen. Die rekombinante Expression von NP resultiert in der Bildung sog. *inclusion bodies* (Abb. 15B), wie sie auch während der EBOV Infektion auftreten. Diese Strukturen sind Akkumulationen viraler Proteine, in denen wahrscheinlich virale Transkription, Replikation und *Assembly* von Nukleokapsiden stattfinden. Neben NP co-lokalisieren auch VP30 sowie VP35 in diesen *inclusion bodies*.



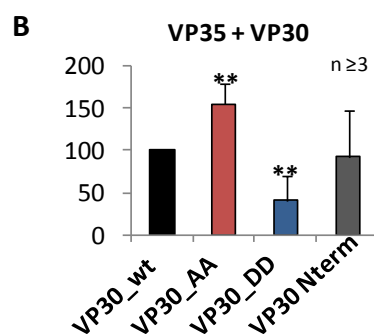
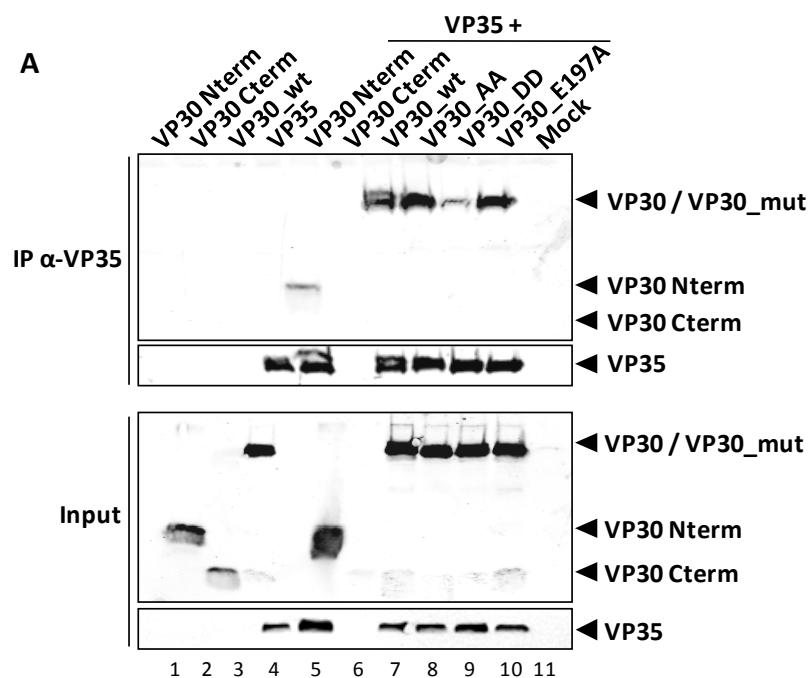
**Abbildung 15: Interaktion von VP30 mit VP35.** **A. Co-Immunpräzipitationsanalyse von VP30 mit VP35.** HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert. 48 h p.t. erfolgte die Lyse und Immunpräzipitation (3.2.4) des HA-markierten VP35 mit  $\alpha$ -HA Agarose. Im Anschluss wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (12 %) und Western Blot separiert (3.4.2 und 3.4.3). Zusätzlich wurde die Expression aller Konstrukte vor der Präzipitation überprüft (Input). Die Co-Präzipitation des *flag*-markierten VP30\_wt wurde mit  $\alpha$ -*flag* (Kaninchen) und  $\alpha$ -Kaninchen IRDye 780 nm (Ziege) nachgewiesen, die Präzipitation des VP35 mit einem monoklonalen biotinylierten  $\alpha$ -HA (Maus) und Streptavidin AlexaFluor 680 nm Antikörper. **B. Immunfluoreszenzanalyse der Interaktion von VP35 mit VP30\_E197A und NP.** HuH7-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert. 48 h p.t. erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen (3.4.1). Die Detektion der Proteine erfolgte unter der Verwendung folgender Antikörper: *flag*-markiertes VP30\_E197A mittels  $\alpha$ -VP30 (Meerschwein) und  $\alpha$ -Meerschwein (Ziege) Alexa 488, HA-markiertes VP35 mittels  $\alpha$ -HA (Maus) und  $\alpha$ -Maus (Ziege) Alexa 594 sowie *myc*-markiertes NP mittels  $\alpha$ -*myc* (Kaninchen) und  $\alpha$ -Kaninchen (Pferd) AMCA.

Durch die Expression von NP sollte daher die Bildung von *inclusion bodies* induziert und eine Konzentrierung des gleichzeitig exprimierten VP35 bewirkt werden. In Gegenwart der unter 4.1.6 charakterisierten VP30-Mutante (VP30\_E197A), die nicht mehr mit NP interagiert, sollte sich zeigen, ob VP30 durch VP35 in die NP-Einschlusskörper relokalisiert werden kann. Die

Co-Expression von NP mit VP35 resultierte in der Rekrutierung von VP35 in NP-induzierte *inclusion bodies* (Abb. 15C), während die Co-Expression von NP mit VP30\_E197A zu keiner Co-Lokalisation führte (Abb. 15D). Nach Expression von NP, VP35 und VP30\_E197A wurde VP30\_E197A in die *inclusion bodies* rekrutiert (Abb. 15E, weiße *inclusions*). Außerdem konnte eine direkte Interaktion von VP30\_E197A mit VP35 mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Abb. 16A, Spur 10). Dieses Ergebnis bestätigte die Interaktion zwischen VP30 und VP35.

#### 4.1.8 EINFLUSS DER PHOSPHORYLIERUNG DES VP30 AUF DIE INTERAKTION MIT VP35

Als nächstes galt es zu untersuchen, inwieweit sich der Phosphorylierungsstatus des VP30 auf die Interaktion mit VP35 auswirkt und ob die Interaktion über den VP30 N- oder C-Terminus vermittelt wird. Dazu wurde erneut eine Co-Immunpräzipitationsanalyse mit  $\alpha$ -HA Agarose durchgeführt.



**Abbildung 16: Interaktion der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit VP35. A. Co-Immunpräzipitationsanalyse der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit VP35.** HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert. 48 h p.t. erfolgte die Lyse und Immunpräzipitation des HA-markierten VP35 mit  $\alpha$ -HA Agarose (3.2.4). Im Anschluss wurden die Proteine via SDS-PAGE (15 %) und Western Blot separiert (3.4.2 und 3.4.3). Die Co-Präzipitation der *flag*-markierten VP30 Mutanten wurde mit einem  $\alpha$ -*flag* (Kaninchen) und einem  $\alpha$ -Kaninchen IRDye 780 nm (Ziege) Antikörper nachgewiesen, die Präzipitation des VP35 mit einem monoklonalen biotinylierten  $\alpha$ -HA (Maus) und Streptavidin AlexaFluor 680 nm Antikörper. **B. Quantitative Auswertung der Co-Immunpräzipitationsanalyse.** Die Präzipitation von VP30\_wt durch VP35 wurde 100 % gesetzt. Statistische Relevanz zu VP30\_wt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Interaktion des VP35 mit VP30 wahrscheinlich über dessen N-Terminus (AS 1-141) vermittelt wird (Abb. 16A, IP Spur 5 sowie 16B). Zur Interaktion der VP30 C-Terminus (AS 142-272) mit VP35 lässt sich keine Aussage treffen, da die Expression des VP30 C-Terminus einen negativen Einfluss auf die Expression des VP35 besaß (Abb. 16A, Input und IP Spur 6). Darüberhinaus ließ sich beobachten, dass HA-markiertes VP35 im Vergleich zu VP30\_wt besser mit VP30\_AA ( $\triangleq$  dephosphoryliertes VP30) interagieren konnte (155 %). Die Interaktion mit VP30\_DD ( $\triangleq$  permanent phosphoryliertes VP30) war hingegen deutlich abgeschwächt (Abb. 16A, IP Spur 8-9 sowie 16B).

Insgesamt lässt sich aussagen, dass die Phosphorylierung des VP30 Auswirkungen auf die Interaktion mit NP und VP35 besaß: phosphoryliertes VP30 (VP30\_DD) interagierte besser mit NP, allerdings war die Interaktion von NP mit dephosphoryliertem VP30 (VP30\_AA) unbeeinflusst. Außerdem beeinflusste die Phosphorylierung des VP30 die Interaktion mit VP35: Dephosphoryliertes VP30 (VP30\_AA) interagierte verstärkt mit VP35, während die phosphoryliertes VP30 (VP30\_DD) zu einer deutlichen Reduktion der Interaktion führte. Diese Erkenntnisse, zusammen mit dem positiven Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die Replikation deuten darauf hin, dass durch die Phosphorylierung des VP30 die Zusammensetzung des Polymerasekomplexes modifiziert wird: VP30 kann nun nicht mehr ausreichend mit VP35 interagieren und wird wahrscheinlich auf diese Weise aus dem Transkriptasekomplex ausgeschlossen. Welche Rolle die Bindung des VP30 an NP in diesem Zusammenhang spielt, bleibt allerdings unklar.

## 4.2 DIE ROLLE DER DYNAMISCHEN PHOSPHORYLIERUNG DES VP30 FÜR DIE PRIMÄRE VIRALE TRANSKRIPTION

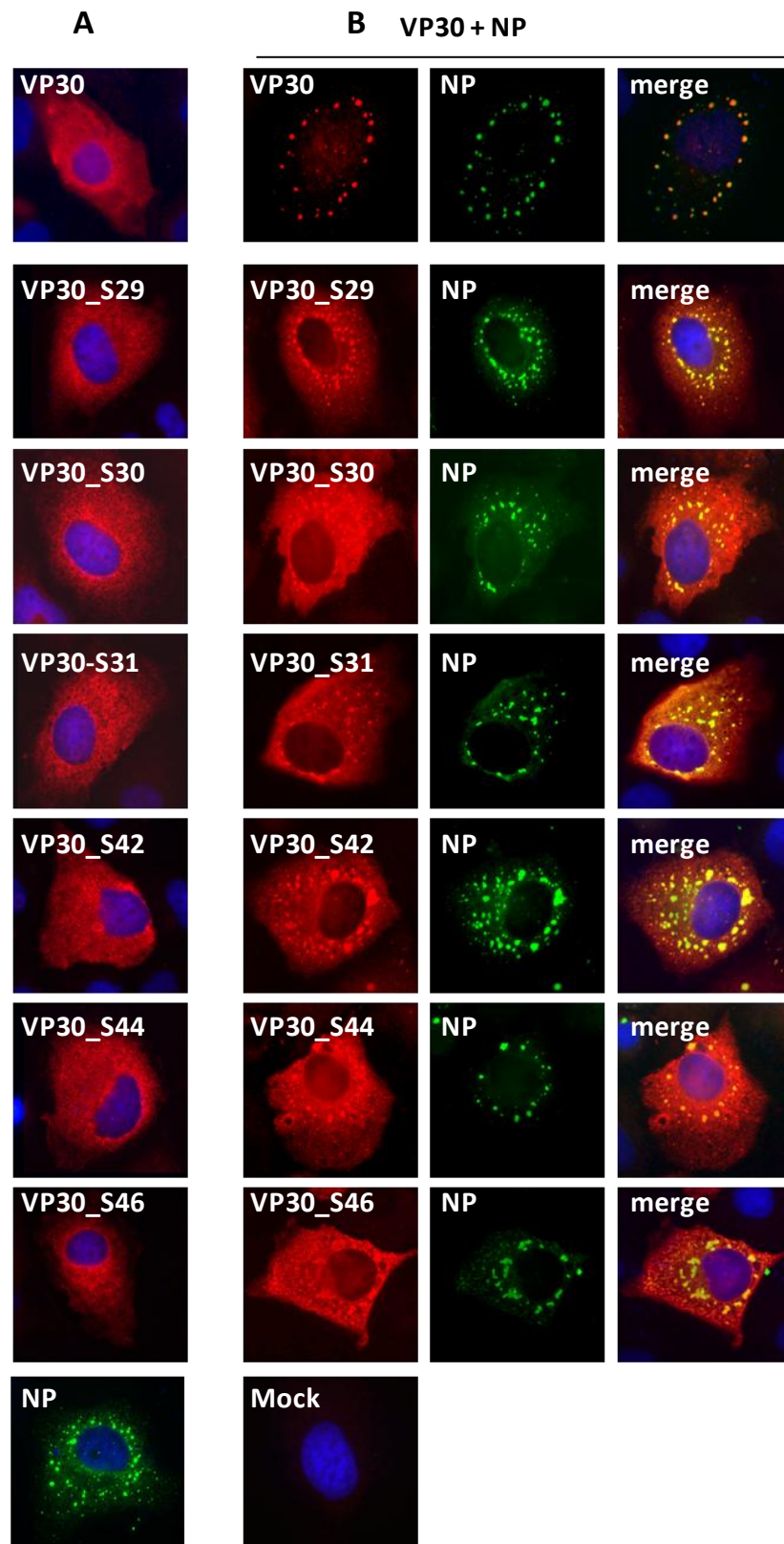
In früheren eigenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Dynamik der Phosphorylierung des VP30 eine entscheidende Rolle für die Initiation der Primären Transkription spielte (23). Nichtphosphoryliertes VP30\_AA aktivierte zwar die Sekundäre Transkription in späten Phasen des viralen Replikationszyklus, wenn eine ausreichende Anzahl viraler Proteine sowie Minigenome bereits vorhanden war (VLP-Synthesezellen). Allerdings konnte VP30\_AA nicht die Primäre Transkription induzieren, wenn ausschließlich die limitierten inkorporierten Nukleokapsidproteine zur Verfügung standen (Indikatorzellen). Nur wenn phosphorylierbare Serinreste innerhalb der VP30 Phosphorylierungsdomäne vorhanden waren, ließ sich eine Aktivierung der Primären Transkription nachweisen (AS S29-31 oder S42, S44, S46).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob einzelne Serinreste innerhalb der beiden Serincluster präferenziell phosphoryliert werden und so eine besonders wichtige Rolle für die Primäre Transkription besitzen.

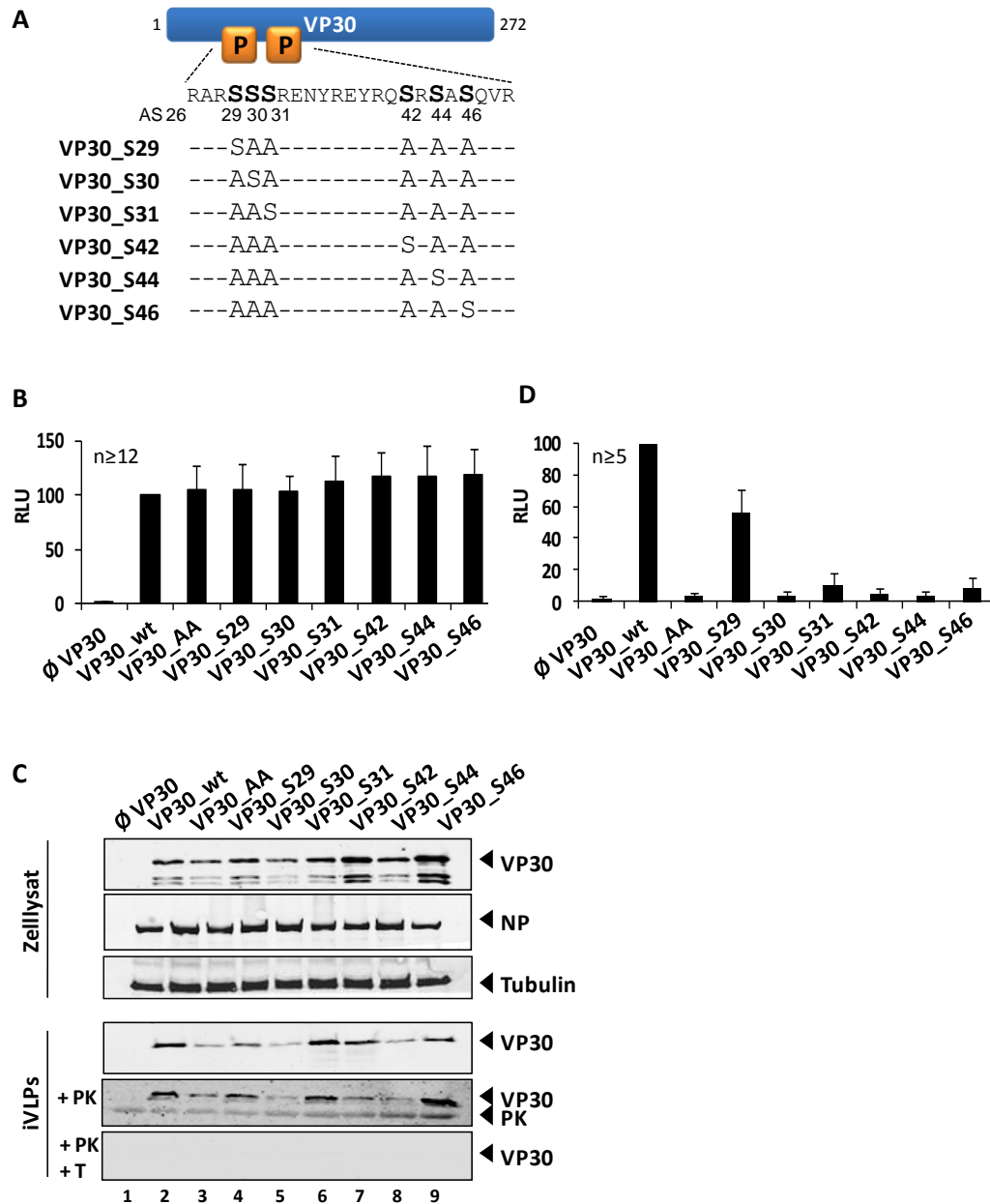
### 4.2.1 EINFLUSS DER DYNAMISCHEN PHOSPHORYLIERUNG SINGULÄRER SERINRESTE DES VP30 AUF DIE PRIMÄRE TRANSKRIPTION IM iVLP-ASSAY

Der Einfluss einzelner Serinreste des VP30 auf die Primäre Transkription sollte im Rahmen eines iVLP-Assays untersucht werden (1.6.1 und 3.2.5). Dazu wurden mittels ortsgerichteter *in vitro*-Mutagenese sechs verschiedene VP30\_Mutanten hergestellt, die durch jeweils nur einen phosphorylierbaren Serinrest charakterisiert waren (Abb. 18A) (3.1.3). Alle anderen fünf Serinreste wurden zu nichtphosphorylierbaren Alaninresten substituiert, die den dephosphorylierten Zustand des VP30 widerspiegeln.

Zunächst sollten die VP30 Einzelserinmutanten hinsichtlich ihres zytoplasmatischen Erscheinungsbildes charakterisiert werden. Dazu wurden HuH7-Zellen wie unter 3.2.2 beschrieben mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert und 16 h danach einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse unterzogen (3.4.1). Abbildung 17A zeigt die Verteilung der VP30 Serinmutanten nach Einzelexpression: alle VP30 Konstrukte zeigten die typisch diffuse Verteilung des VP30 im Zytoplasma. Nach zusätzlicher Expression von NP wurde ein Teil der VP30 Serinmutanten in *inclusion bodies* ankonzentriert, wobei jedoch der größere Anteil des VP30 diffus im Zytoplasma verteilt blieb (Abb. 17B). Es zeigten sich dabei keine Unterschiede zwischen den VP30 Einzelserinmutanten hinsichtlich ihrer Verteilung.



**Abbildung 17: Charakterisierung der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit NP in der Immunfluoreszenzanalyse.** HuH7-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert. 48 h p.t. erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen (3.4.1). Die Detektion der Proteine erfolgte unter der Verwendung folgender Antikörper: VP30 mittels  $\alpha$ -VP30 (Meerschweinchen) und  $\alpha$ -Meerschweinchen (Ziege) Rhodamin, NP mittels  $\alpha$ -NP B6C5 (Maus) und  $\alpha$ -Maus (Ziege) FITC sowie eine Färbung der Zellkerne mit DAPI. **A. Einzeldisplay.** **B. Co-Expression von VP30 und NP.**



**Abbildung 18: Einfluss singulärer Serinreste des VP30 auf den viralen Replikationszyklus. A. Schematische Darstellung der VP30 Einzelerinmutanten.** Alle VP30 Mutanten besitzen jeweils nur einen phosphorylierbaren Serinrest, während alle anderen ursprünglichen Serinreste der beiden Serincluster zu Alaninen ( $\Delta$  dephosphorylierte Serinreste) substituiert sind. **B. Reporteraktivität in VLP-Synthesezellen.** HEK293-Zellen wurden unter 3.2.5 beschrieben transfiziert und VP30\_wt durch die jeweiligen VP30 Einzelerinmutanten ersetzt. 72 h p.t. wurden die Zellen lysiert und die Reporteraktivität (RLU, *relative light units*) ermittelt. Die Reporteraktivität von VP30\_wt wurde 100 % gesetzt. **C. Expression von VP30\_wt und Einzelerinmutanten in VLP-Synthesezellen und Inkorporation in iVLPs.** Die in B. erhaltenen Zellysate wurden mit SDS-PAGE (12 %) und Western Blot Analyse hinsichtlich der Expression der *flag*-markierten VP30 Mutanten untersucht (3.4.2 und 3.4.3). Die Expression von NP sowie des zellulären Proteins Tubulin wurde ebenfalls nachgewiesen. Nach Ankonzentrierung der iVLPs wurde die Inkorporation des VP30 in die iVLPs durch Proteinase K-Verdau (+PK) überprüft (3.2.5). Zur Kontrolle der Protease-Aktivität wurde Triton X100 als Detergenz hinzugefügt (+PK+T). Die Detektion der Proteine erfolgte im LiCor Odyssey nach Verwendung folgender Antikörper:  $\alpha$ -*flag* (Maus) und  $\alpha$ -Maus (Ziege) Alexa 680 nm für VP30 sowie  $\alpha$ -NP (Huhn) und  $\alpha$ -Huhn (Esel) Alexa 680 nm und  $\alpha$ -Tubulin (Kaninchen) und  $\alpha$ -Kaninchen (Ziege) Alexa 680 nm. **D. Reporteraktivität in Indikatorzellen.** Nach Freisetzung der iVLPs in den Überstand der VLP-Synthesezellen wurden diese wie unter 3.2.5 beschrieben ankonzentriert und zur Infektion der Indikatorzellen (HuH7) verwendet. 60 h p.i. erfolgte die Lyse der Zellen und die Bestimmung der Reporteraktivität. Diese stellt in den Indikatorzellen ein Maß für die primäre virale Transkription dar, da alle viralen Nukleokapsidproteine inkorporiert und in den Indikatorzellen zur Verfügung stehen müssen. Die Reporteraktivität von VP30\_wt wurde 100 % gesetzt. Statistische Relevanz zu VP30\_wt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .



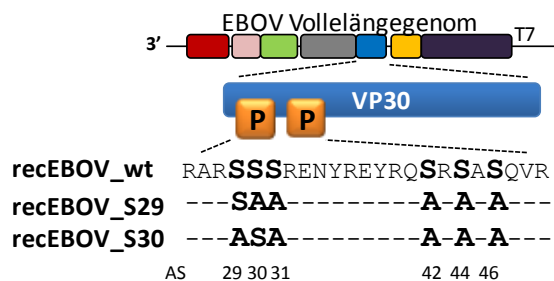
Die Einzelserinmutanten wurden anschließend in einem iVLP-Assay hinsichtlich ihrer Reportergenaktivität während der Sekundären Transkription (VLP-Synthesezellen) untersucht (1.6.1 und 3.2.5). Alle VP30 Einzelserinmutanten waren in der Lage, die Transkription in VLP-Synthesezellen ähnlich wie VP30\_wt oder auch VP30\_AA zu unterstützen (Abb. 18B). Hier stehen aufgrund der rekombinanten Expression alle viralen Proteine in ausreichenden Mengen zur Verfügung und das Minigenom dient als Template für virale Transkription sowie Replikation. Die Expression der Serinmutanten sowie die von NP und des zellulären Proteins Tubulin wurde mittels Western Blot Analyse kontrolliert (3.4.2 und 3.4.3) (Abb. 18C). Zusätzlich wurde überprüft, inwieweit die VP30 Einzelserinmutanten durch die Interaktion mit NP in die generierten iVLPs rekrutiert werden. Dazu wurden die aufgereinigten iVLPs einem Proteinase K Verdau und anschließender Western Blot Analyse unterzogen (3.2.5). Im Vergleich zu unbehandelten iVLPs (Abb. 18, oben) zeigte die Behandlung mit Proteinase K (Abb. 18C, +PK) keine Unterschiede hinsichtlich der Inkorporation der VP30 Einzelserinmutanten in iVLPs. Das unterschiedlich starke Bandenmuster der jeweiligen Einzelserinmutanten lässt sich auf die Expressionsstärke in den VLP-Synthesezellen zurückführen, die damit korreliert. Alle Einzelserinmutanten wurden also unabhängig von ihrer Ankonzentrierung in *inclusion bodies* in iVLPs inkorporiert. Als nächstes war es interessant zu untersuchen, inwieweit die VP30 Einzelserinmutanten unter den limitierten Bedingungen in Indikatorzellen die Primäre Transkription induzieren können. Ausschließlich die inkorporierten Nukleokapsidproteine können hier, wie zu Beginn einer authentischen Virusinfektion, die initialen Schritte der Virusvermehrung in die Wege leiten. Dafür wurden naive Indikatorzellen mit den aufgereinigten iVLPs infiziert. Die Lyse der Indikatorzellen und anschließende enzymatische Bestimmung der Reportergenaktivität erfolgte nach 60 h. Interessanterweise war zu beobachten, dass ausschließlich die Einzelserinmutante VP30\_S29 die Primäre Transkription in den Indikatorzellen initiieren konnte (Abb. 18D). Alle anderen Einzelserinmutanten waren dazu nicht in der Lage und besaßen eine ähnliche Hintergrundaktivität wie VP30\_AA. Ein einzelner phosphorylierbarer Serinrest an Position 29 war also ausreichend, um VP30 unter limitierten Bedingungen in einen transkriptionsaktiven Zustand zu versetzen.

#### 4.2.2 GENERIERUNG VON REKOMBINANTEN EBOLAVIREN

Von Studien mit iVLP-Assays war bisher bekannt, dass dephosphoryliertes VP30 (VP30\_AA) in späten Stadien des viralen Replikationszyklus die Transkription unterstützt. Für die Primäre Transkription jedoch war eine dynamische Phosphorylierung von Serinresten unbedingt erforderlich (23). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Generierung eines rekombinanten EBOV ohne phosphorylierbare Serinreste an den Phosphorylierungsstellen des VP30 nicht möglich war (126, 128).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe des iVLP-Systems demonstriert werden, dass die dynamische Phosphorylierung an Serinrest 29 ausreichend war, um die Primäre Transkription in Indikatorzellen einzuleiten. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass ein Serinrest an Position 29 des VP30 ebenfalls ausreichend ist, um ein rekombinantes EBOV zu generieren. Hingegen sollte ein einzelnes Serin an Position 30 nicht ausreichend sein, da dieses die Primäre Transkription nicht unterstützte (Abb. 18 D).

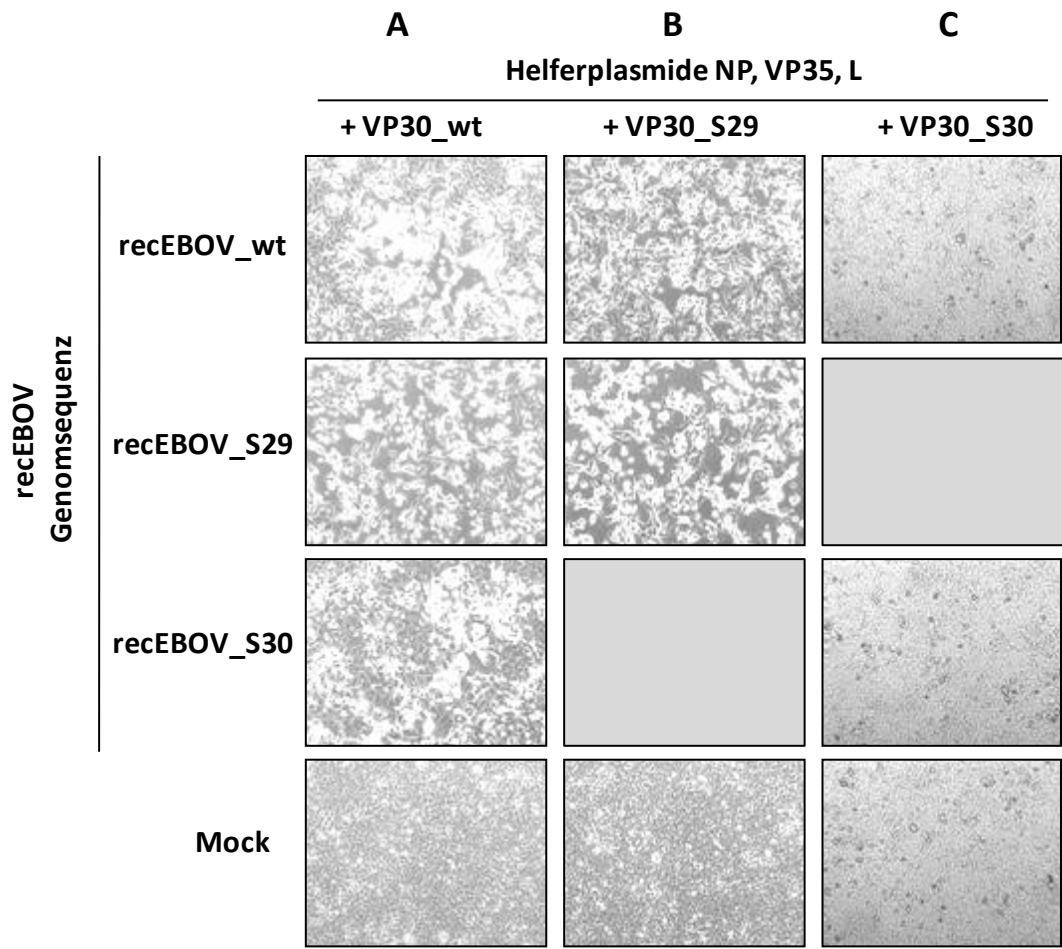
Zur Erzeugung rekombinanter Viren (*Rescue*) wird ein DNA-Plasmid verwendet, welches die gesamte genetische Information des Virus enthält (1.6.2 und 3.3.1). Ausgehend von diesem Plasmid wurde eine Genkassette, die das VP30 Gen enthielt, in einen kleineren Vektor subkloniert. Die Genkassette wurde mittels *in vitro* Mutagenese modifiziert und anschließend in den Ursprungsvektor zurücktransferiert (3.3.1).



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der rekombinanten EBOV.** Die generierten rekombinanten EBOV (recEBOV) besitzen in ihrem Volllänge-Virusgenom jeweils nur einen einzigen phosphorylierbaren Serinrest innerhalb der VP30 Phosphorylierungsdomäne. Die Klonierung erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben.

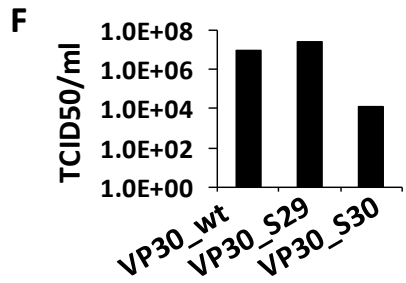
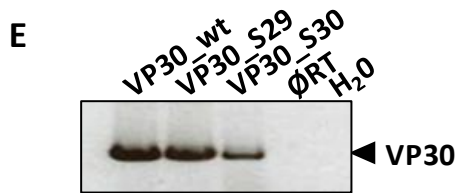
Neben dem Volllängeplasmid mit Serinrest 29 als einziger mögliche Phosphorylierungsstelle innerhalb des VP30 wurde außerdem ein Volllängeplasmid mit ausschließlich Serinrest 30 als hergestellt (Abb. 19). Nach Klonierung der Volllängekonstrukte erfolgte der Rescue unter BSL4-Bedingungen. Das durch die T7-Polymerase synthetisierte einzelsträngige Virusgenom wird mit Hilfe der von Helferplasmiden exprimierten Nukleokapsidproteine NP, L, VP35 und VP30 in mRNA transkribiert. Neue virale Proteine werden so exprimiert und zusammen mit neu repliziertem Virusgenom in neue Virionen verpackt und ausgeschleust. Zur Vermehrung der entstandenen rekombinanten Viren werden diese auf neue VeroE6-Zellen transferiert, um hier eine Infektion zu etablieren (Passage 1). Die Entwicklung eines zytopathischen Effekts (*cytopathic effect*, CPE) in Passage 1 zeigt die erfolgreiche Erzeugung eines infektiösen rekombinant hergestellten EBOV an.

Abbildung 20 zeigt den CPE in Passage 1-Zellen sieben Tage nach Infektion. Wenn die Helferplasmide die *wildtypischen* Nukleokapsidproteinen exprimierten, konnte ein rekombinantes EBOV mit nur einer möglichen Phosphorylierungsstelle an Position Serin 29 hergestellt werden (Abb. 20A).



**D**

recEBOV Genomsequenz	Helferplasmide NP, VP35, L		
	+ VP30_wt	+ VP30_S29	+ VP30_S30
recEBOV_wt	4 / 4	4 / 4	2 / 5
recEBOV_S29	4 / 4	4 / 4	nt
resEBOV_S30	4 / 5	nt	0 / 5



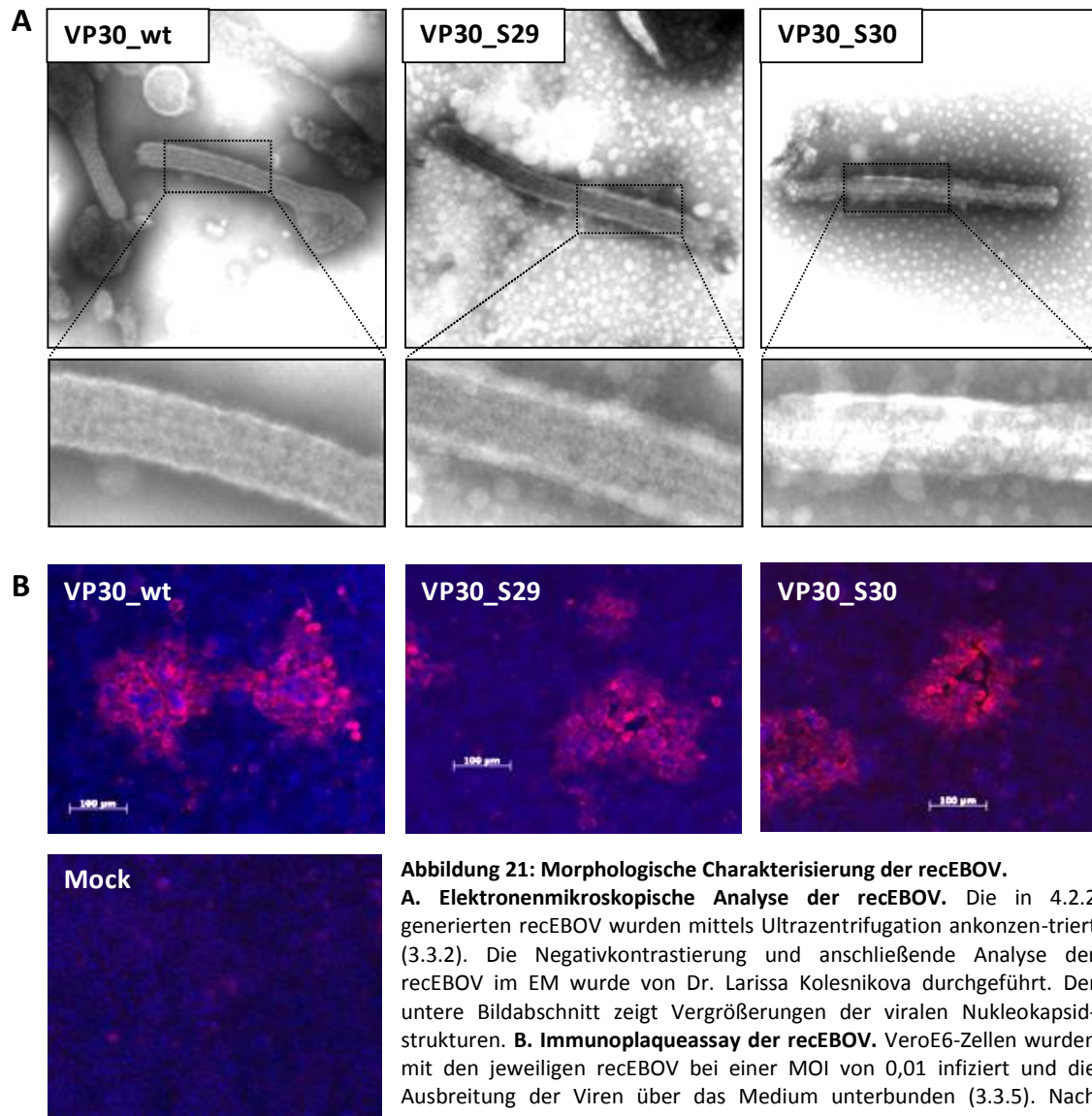
**Abbildung 20: Rescue von recEBOV\_S29 und recEBOV\_S30.** Nach Klonierung der mutierten Volllängeplasmide erfolgte dessen Transfektion zusammen mit den Helferplasmiden (NP, VP35, L und VP30) sowie der T7-Polymerase in VeroE6-Zellen unter BSL4-Bedingungen (3.3.1). Nach sieben Tagen wurde ein Aliquot des Zellkulturüberstandes auf neue VeroE6-Zellen (Passage 1) transferiert, um eine etablierte Infektion nachzuweisen. Die Entwicklung eines zytopathischen Effekts (CPE) wurde im Lichtmikroskop dokumentiert und diente als erster Nachweis eines erfolgreichen Rescues. **A. Entwicklung des CPEs nach Transfektion wildtypischer Helferplasmide. B. Entwicklung des CPEs nach Transfektion von VP30\_S29 als Helferplasmid. C. Entwicklung des CPEs nach Transfektion von VP30\_S30 als Helferplasmid. D. Zusammenfassung.** Die Ermittlung der erfolgreichen Generierung eines recEBOV erfolgte anhand der CPE-Entwicklung in Passage 1. (nt = nicht terminiert). **E. Isolierung viraler RNA aus dem Überstand.** Zur Verifizierung der generierten recEBOV wurde RNA aus dem Zellkulturüberstand der Passage 1 isoliert und eine Reverse Transkription durchgeführt (3.1.6 und 3.1.4). Die synthetisierte cDNA wurde zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen und im Anschluss mit VP30-spezifischen Primern sequenziert (3.1.7 und 3.1.15). RT= Reverse Transkriptase **F. Titer der recEBOV.** Zur Herstellung von Virusstocks wurde ein Aliquot des Überstandes der Passage 1 auf neue VeroE6-Zellen transferiert (3.3.2). Die Inkubation erfolgte bis sich ein prominenter CPE entwickelt hatte. Im Anschluss wurden die infektiösen Titer pro ml mittels TCID<sub>50</sub>-Analyse bestimmt (3.3.3).

Man erkennt einen typischen CPE bei der Positivkontrolle recEBOV\_wt sowie bei recEBOV\_S29. Der eigentlich konfluente Zellrasen (siehe Mock) ist hier deutlich zerstört; die Zellen sind abgerundet und aus dem Zellverband herausgelöst. Überraschenderweise ließ sich auch ein CPE beobachten, wenn ausschließlich Serinrest 30 als mögliche Phosphorylierungsstelle innerhalb des VP30 zur Verfügung stand (recEBOV\_S30). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den mittels iVLP-Assays gewonnenen Erkenntnissen. Hier war die einzige Phosphorylierungsstelle an Position 30 des VP30 nicht ausreichend, um dessen essentielle Funktion für die Transkription zu gewährleisten. Um diesen möglichen Widerspruch näher zu betrachten, wurde der experimentelle Aufbau modifiziert: Bisher war das vom Helferplasmid exprimierte VP30\_wt für die initiale Transkription der viralen mRNA unter den Rescue-Bedingungen verantwortlich. Erst nach erfolgter Synthese neuer viraler Proteine ausgehend von dem mutierten EBOV Genom steht auch mutiertes VP30 (VP30\_S29 bzw. VP30\_S30) zur Verfügung, dessen Funktion als Transkriptionsaktivator dann in neuen Replikationszyklen untersucht werden kann. Das von Helferplasmiden exprimierte VP30\_wt wird wahrscheinlich auch in Nachkommenviren eingebaut und verliert sich erst durch Verdünnung im Zuge der Passagierung des rekombinanten Virus. In einem weiteren Ansatz sollte daher untersucht werden, inwieweit ein Rescue des mutierten Volllängegegensoms gelingt, wenn von Beginn an ausschließlich mutiertes VP30 im System zur Verfügung steht. Daher wurde das VP30\_wt als Helferplasmid durch die jeweilige VP30-Mutante, VP30\_S29 (Abb. 20B) oder VP30\_S30 (Abb. 20C) ersetzt. Die Entwicklung des CPEs demonstrierte, dass VP30\_S29 als Helferplasmid in der Lage war, ein recEBOV\_S29 zu generieren (Abb. 20B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die mögliche Phosphorylierung am Serinrest 29 für die Generierung eines recEBOV ausreichend war. In weiteren Experimenten wurde deutlich, dass ein recEBOV\_S30 ohne die Anwesenheit eines *wildtypischen* VP30 als Helferplasmid nicht hergestellt werden konnte (Abb. 20C und D). Dies bedeutet, dass die Phosphorylierung an Serinrest 30 nicht

ausreicht, VP30 in einen Zustand zu versetzen, der die Transkription des EBOV Genoms unter den Bedingungen dieses Versuchsaufbaus erlaubt. Auch die zusätzlichen Kontrollen, inwieweit VP30\_S29 bzw. VP30\_S30 als Helferplasmid die initialen Schritte der Synthese eines *wildtypischen* EBOV Vollelängen-genoms unterstützen können, machen die Unterschiede beider Proteine deutlich (Abb. 20 B und C). VP30\_S30 konnte nur in zwei von fünf Versuchen ein recEBOV\_wt generieren. Im Gegensatz dazu war dies mit VP30\_S29 in allen Ansätzen möglich (Abb. 20D). Zur Verifizierung der jeweiligen recEBOV wurde aus dem Überstand der Passage 1 (Abb. 20A) virale RNA isoliert (3.1.6), diese anschließend einer Reversen Transkription unterzogen und mit VP30-spezifischen Primern amplifiziert und sequenziert (3.1.4 und 3.1.15). Vor der Sequenzierung wurde ein Aliquot der amplifizierten cDNA auf ein Agarosegel aufgetragen (3.1.7) (Abb. 20E). Es zeigte sich eine VP30-spezifische Bande bei beiden mutierten rekombinanten Viren, recEBOV\_S29 und recEBOV\_S30 sowie bei recEBOV\_wt. Die erwarteten Sequenzen konnten im Chromatogramm der Sequenzierung verifiziert werden. Für weiterführende Experimente wurden Virusstocks hergestellt und deren infektiöse Titer mittels TCID<sub>50</sub>-Analyse bestimmt (3.3.2 und 3.3.3). Dabei wurden jeweils recEBOV angezüchtet, deren Rescue mit VP30\_wt als Helferplasmid gelungen war (Abb. 20A). Es ergab sich für recEBOV\_S29 ein Virustiter von  $2,81 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml, der sogar höher war als der infektiöse Titer des recEBOV\_wt mit  $8,89 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml (Abb. 20F). Für das recEBOV\_S30 konnte ein verzögertes Wachstum beobachtet werden; ein deutlicher CPE etablierte sich hier erst 17 d nach der Infektion. Außerdem war der Virustiter mit  $1,58 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml im Vergleich zu recEBOV\_wt und recEBOV\_S29 um etwa 3 log-Stufen reduziert.

#### 4.2.3 MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN EBOLAVIREN UND DEREN PLAQUEBILDUNG

Nach der erfolgreichen Generierung von recEBOV mit jeweils einem Serinrest innerhalb der VP30 Phosphorylierungsdomäne wurden die Viren zunächst morphologisch charakterisiert. Dazu wurden die recEBOV mittels Ultrazentrifugation ankonzentriert und nach Negativkontrastierung im Elektronenmikroskop (EM) analysiert (3.3.2 und 3.4.5) (Abb. 21A). Insgesamt ließen sich keine Unterschiede in der Negativkontrastierung hinsichtlich der Virusmorphologie feststellen. Sowohl recEBOV\_S29 als auch recEBOV\_S30 zeigten die regelmäßige Struktur der inkorporierten Nukleokapside wie recEBOV\_wt und unterschieden sich nicht in der Größe der Viruspartikel. Ausschließlich bezüglich der Partikelanzahl gab es Unterschiede. Während die Präparation des recEBOV\_S29 ähnlich viele Viruspartikel enthielt wie recEBOV\_wt, wies die Präparation des recEBOV\_S30 deutlich weniger Partikel auf, was den unter 4.2.2 ermittelten Virustitern entsprach.



**Abbildung 21: Morphologische Charakterisierung der recEBOV.**

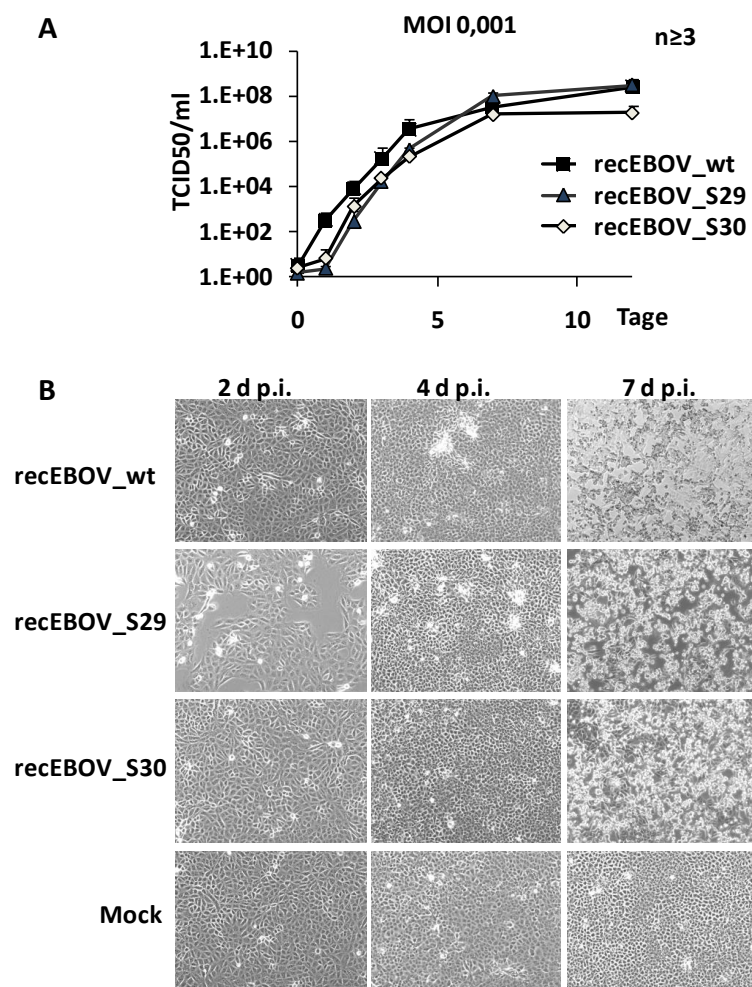
**A. Elektronenmikroskopische Analyse der recEBOV.** Die in 4.2.2 generierten recEBOV wurden mittels Ultrazentrifugation ankonzentriert (3.3.2). Die Negativkontrastierung und anschließende Analyse der recEBOV im EM wurde von Dr. Larissa Kolesnikova durchgeführt. Der untere Bildabschnitt zeigt Vergrößerungen der viralen Nukleokapsidstrukturen. **B. Immunoplaqueassay der recEBOV.** VeroE6-Zellen wurden mit den jeweiligen recEBOV bei einer MOI von 0,01 infiziert und die Ausbreitung der Viren über das Medium unterbunden (3.3.5). Nach sieben Tagen erfolgten die Fixierung der Zellen und das Anfärben der Virusplaques mit  $\alpha$ -EBOV-Serum (Ziege) und einem  $\alpha$ -Ziege Rhodamin-gekoppeltem Antikörper (Esel) und die Färbung der Zellkerne mit DAPI.

Weiterhin wurden die Charakteristika der rekombinanten Viren mittels Immunoplaquefärbung charakterisiert (3.3.5). Hier wurde nach Infektion der Zellen durch Zugabe eines sehr viskosen Mediumgemisches die Ausbreitung der Viren über das Medium verhindert, so dass ausschließlich benachbarte Zellen infiziert werden können. Von allen rekombinanten Viren wurde die gleiche infektiöse Virusmenge (MOI 0,01, *multiplicity of infection*) zur Infektion verwendet. Die Färbung der Plaques erfolgte 4 d p.i durch eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse (3.4.1). Es lässt sich erkennen, dass beide mutierten Viren, recEBOV\_S29 und recEBOV\_S30 morphologisch ähnliche Virusplaques ausbildeten wie recEBOV\_wt, die sich in ihrer Größe nicht wesentlich unterschieden (Abb. 21B). Die reduzierte Anzahl der Virusplaques bei recEBOV\_S30 deutet erneut auf ein verlangsamtes Wachstum hin. Dies wurde hier allerdings nicht quantitativ ausgewertet. Insgesamt ließen sich hinsichtlich der Morphologie

der Viruspartikel und der von ihnen erzeugten Plaques keine Unterschiede von recEBOV\_S29 und recEBOV\_S30 im Vergleich zu recEBOV\_wt feststellen.

#### 4.2.4 WACHSTUMSVERHALTEN DER REKOMBINANTEN EBOLAVIREN

Um die Infektiosität der recEBOV näher zu charakterisieren, wurde das Wachstumsverhalten der Viren in VeroE6-Zellen untersucht. Es wurde eine Wachstumskinetik mit einer niedriger initialen Viruslast (MOI 0,001) sowie mit einer hohen Viruslast (MOI 1) erstellt. Aufgrund des niedrigen Titers ließ sich für recEBOV\_S30 nur eine Wachstumskinetik bei einer MOI 0,001 ermitteln. Es wurden über einen Zeitraum von zwölf Tagen nach Infektion Proben aus dem Überstand entnommen und mittels TCID<sub>50</sub>-Analyse titriert (3.3.3).



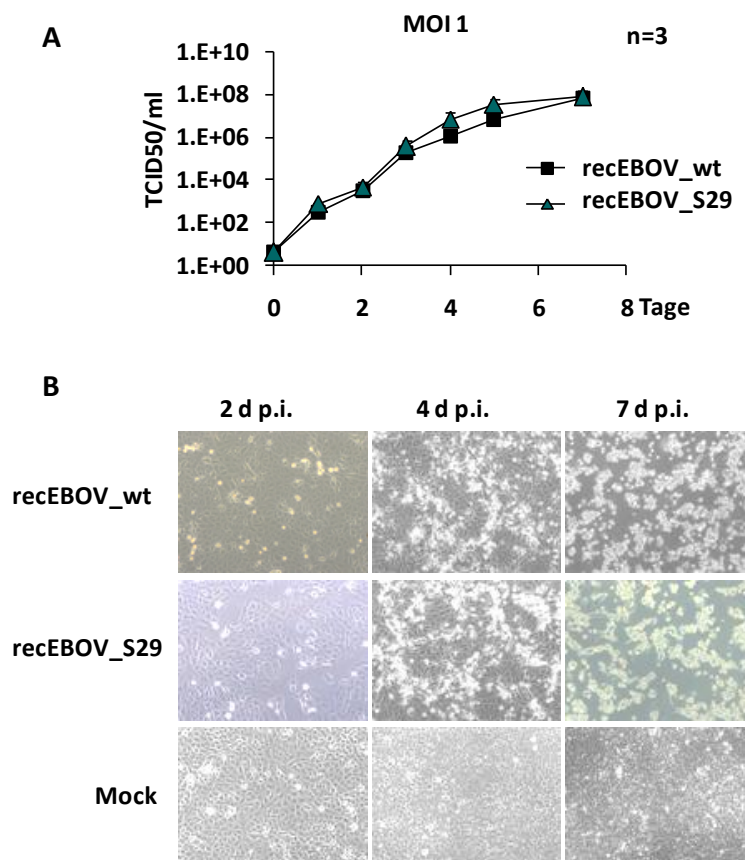
**Abbildung 22: Wachstumskinetik von recEBOV bei niedriger MOI. A. Infektiöse Titer.** VeroE6-Zellen wurden wie unter 3.3.2 beschrieben mit recEBOV\_wt, recEBOV\_S29 oder recEBOV\_S30 bei einer MOI von 0,001 infiziert. Es wurden an Tag 0, 1, 2, 3, 4, 7 und 12 p.i. Proben aus dem Überstand entnommen und per TCID<sub>50</sub> - Analyse deren infektiöse Titer bestimmt (3.3.3). **B. Entwicklung des CPEs.** Die Entwicklung des CPEs im Verlauf der Infektion wurde im Lichtmikroskop für die Tage 2, 4 und 7 p.i. dokumentiert.

Abbildung 22 zeigt die graphische Auswertung der Wachstumskinetik bei einer MOI von 0,001 sowie die Entwicklung des CPEs in den infizierten Zellen zum Zeitpunkt 2, 4 und 7 Tage nach



der Infektion. Es zeigte sich im Vergleich zu recEBOV\_wt bei beiden mutierten Viren ein verzögertes Wachstumsverhalten in den ersten vier Tagen. Während die Titer zu Beginn bis zu 2 log-Stufen reduziert waren, wurden nach sieben Tagen mit recEBOV\_wt vergleichbare Endtiter erreicht (ca.  $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml). Überraschenderweise konnte auch recEBOV\_S30 das anfänglich verzögerte Wachstum kompensieren und blieb nur ca. 1 log-Stufe hinter den Endtitern von recEBOV\_wt und recEBOV\_S29 zurück. Im Hinblick auf frühere Versuche war dies unerwartet, da sich bereits während der Generierung sowie der Virusanzucht ein verzögertes Wachstum von recEBOV\_S30 abzeichnete (siehe Abb. 20).

Die Infektion von VeroE6-Zellen mit einer hohen MOI von 1 zeigte keine Unterschiede im Wachstumsverhalten von recEBOV\_S29 im Vergleich zu recEBOV\_wt (Abb. 23A). Dies ließ sich auch anhand der CPE-Entwicklung im Lichtmikroskop erkennen (Abb. 23B). Die initiale Menge an Viruspartikeln war hier vermutlich ausreichend, um eine Infektion ähnlich dem recEBOV\_wt etablieren zu können.



**Abbildung 23: Wachstumskinetik von recEBOV bei hoher MOI. A. Infektiöse Titer.** VeroE6-Zellen wurden wie unter 3.3.2 beschrieben mit recEBOV\_wt oder recEBOV\_S29 mit einer MOI von 1 infiziert. Es wurden an Tag 0, 1, 2, 3, 4 und 7 p.i. Proben aus dem Überstand entnommen und per TCID<sub>50</sub>-Analyse (3.3.3) deren infektiöser Titer bestimmt. **B. Entwicklung des CPEs.** Die Entwicklung des CPEs im Verlauf der Infektion wurde im Lichtmikroskop für die Tage 2, 4 und 7 p.i. dokumentiert.

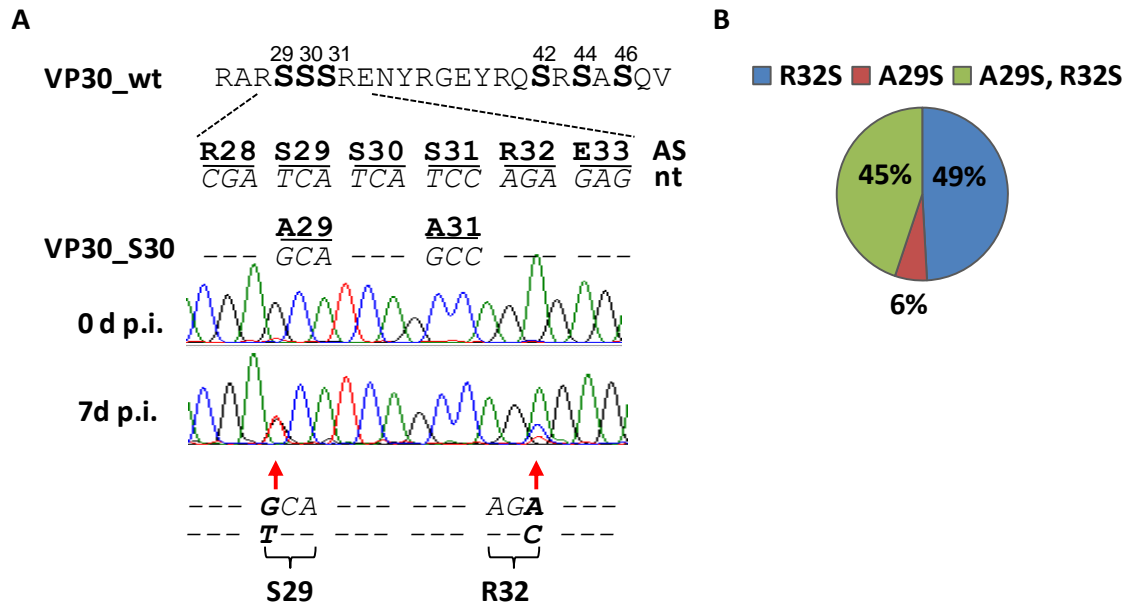


Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Wachstum des recEBOV\_S29 bei niedriger initialer Viruslast zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion reduziert war. Allerdings konnte dies im Verlauf der Infektion kompensiert werden, so dass sich zu späteren Zeitpunkten ebenso wie bei Infektion mit einer hohen Viruslast das Wachstumsverhalten nicht von dem des recEBOV\_wt unterschied.

#### 4.2.5 AUFTRETEN VON REVERTANTEN DES recEBOV\_S30

Überraschenderweise generierte das recEBOV\_S30 im Verlauf der Wachstumskinetik Virustiter, die sich um nur 1 log-Stufe vom Endtiter des recEBOV\_wt unterschieden. Dies war nach den Ergebnissen der iVLP-Versuche und des Virus-Rescues von recEBOV\_S30 jedoch unerwartet. Erst nach 17 Tagen konnte bei recEBOV\_S30 die Ausprägung eines prominenten CPEs beobachtet werden; zudem war der anfängliche Titer um 3 log-Stufen im Vergleich zu recEBOV\_wt reduziert (Abb. 20F). Um diesen Widerspruch näher zu untersuchen, wurden die Überstände der Wachstumskinetik hinsichtlich möglicher adaptiver Mutationen im Genom von recEBOV\_S30 untersucht. Dafür wurde virale RNA aus den Überständen (Tag 7) isoliert und nach Reverser Transkription die cDNA mit VP30-spezifischen Primern amplifiziert und sequenziert (3.1.6, 3.1.4 und 3.1.15). Das Chromatogramm der Sequenzierung machte im Vergleich zur Sequenz des zur Infektion eingesetzten Stockvirus deutlich, dass das recEBOV\_S30 eine Mischung verschiedener Virusmutanten enthielt (Abb. 24A). An zwei Positionen innerhalb des VP30 war sowohl eine Reversion als auch eine Mutation zu beobachten. Der im Vergleich zur EBOV *Wildtyp*-Sequenz modifizierte Alaninrest an Position 29 zeigte einen Nukleotidaustausch von GCA zu TCA, der in der Reversion des Alaninrestes zum *wildtypischen* Serinrest an dieser Position resultierte. Weiterhin fand sich ein zusätzlicher Nukleotidaustausch von AGA zu AGC, der den Argininrest an Position 32 ebenfalls zu einem Serinrest mutierte. Die Sequenzen des recEBOV\_wt sowie des recEBOV\_S29 (Tag 7 der Wachstumskurve) wurden durch Sequenzierung verifiziert und wiesen ebenso wie das zur Infektion verwendete Stockvirus recEBOV\_S30 keine Mutationen im VP30-Gen auf.

Um die Zusammensetzung der entstandenen Quasispezies des recEBOV\_S30 näher zu charakterisieren, wurde ausgehend von viraler RNA (Tag 7) synthetisierte cDNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen in den Vektor pCAGGS kloniert und mit diesem Konstrukt Bakterien transformiert (3.1.8 bis 3.1.12). Da jeweils nur ein einzelnes cDNA-Molekül in ein Vektorplasmid ligiert wird, sollte durch die Analyse einzelner Bakterienklone, die jeweils nur ein Plasmid enthalten, eine quantitative Analyse der adaptiven Mutationen durchgeführt werden. Die DNA einzelner Bakterienklone wurden dazu per Kolonie-PCR amplifiziert und sequenziert (3.1.2 und 3.1.15). Insgesamt wurden 101 Klone aus fünf unabhängigen Experimenten (zwei verschiedene Virusstocks) sequenziert und ausgewertet (Abb. 24B).



**Abbildung 24: Reversionen des recEBOV\_S30. A. Sequenz und Chromatogramm des recEBOV\_S30.** Die Aminosäure- sowie Nukleotidsequenz des VP30\_S30 ist im Vergleich mit VP30\_wt angegeben. Nach Isolierung der viralen RNA aus dem zur Infektion verwendeten Stockvirus recEBOV\_S30 sowie einer Probe aus dem Überstand 7 d p.i. (4.2.4 Wachstumskurve MOI 0,001) wurden diese nach Reverse Transkription anschließend sequenziert (3.1.6, 3.1.4 und 3.1.15). AS = Aminosäure, nt = Nukleotid **B. Aufgetretene Mutationen des recEBOV\_S30.** Zur näheren Charakterisierung der innerhalb des recEBOV\_S30 aufgetretenen Mutationen wurde die in A. generierte cDNA in den Vektor pCAGGS kloniert. Dabei wurde cDNA von Tag 7 p.i. von fünf unabhängigen Ansätzen verwendet. Nach Transformation in Bakterien wurden 101 Klone mittels Kolonie-PCR VP30-spezifisch sequenziert. Die graphische Auswertung zeigt die aufgetretenen Mutationen in Bezug auf die insgesamt analysierten Proben in %.

Dabei zeigte sich, dass in 49 % aller analysierten Proben ausschließlich die Mutation an Position R32S zu finden war, während in 47 % aller Fälle zusätzlich zu der Mutation R32S noch eine Reversion A29S auftrat. Die Reversion des Alaninrestes 29 zum originalen Serin 29 ohne das zeitgleiche Auftreten der Mutation R32S war nur bei 6 % aller Proben zu beobachten. Allerdings war die chromatographische Analyse der Sequenzierung durch gleich hohe Peaks der ersten Base des Kodons A29S (GCA und TCA) gekennzeichnet. Dies weist daraufhin, dass möglicherweise nach wie vor eine Mischung verschiedener Virusmutanten sequenziert wurde. Ebenso war die Mutation R32S häufig nicht prominent im Chromatogramm der Sequenzierung, sondern fiel durch einen stark erhöhten Hintergrundlevel auf, der an anderen Stellen des Chromatogramms nicht zu beobachten war. Diese Auffälligkeit an Position R32 wurde für die Auswertung als R32S mitberücksichtigt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass es nicht möglich ist, ein stabiles recEBOV\_S30 zu generieren. Ein phosphorylierbares Serin an Position 30 war dafür nicht ausreichend. Zudem traten bereits nach wenigen Replikationszyklen, die durch das VP30\_wt in dem Rescue-System ermöglicht wurden, Mutationen im VP30 Phosphorylierungsbereich auf. Das Auftreten von Revertanten unterstreicht die Bedeutung der Serinrestes S29 für den viralen Lebenszyklus sowie den hohen evolutionären Druck auf die Phosphorylierungsdomäne innerhalb des VP30.

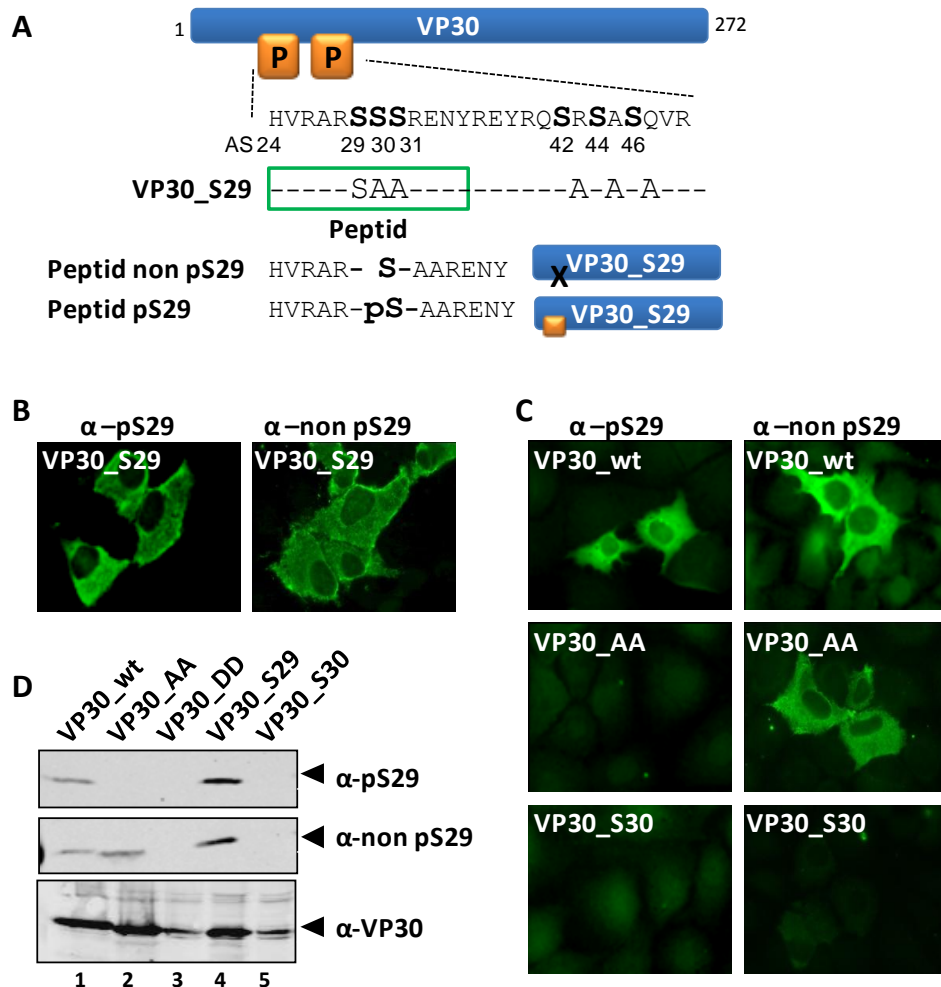
#### 4.2.6 CHARAKTERISIERUNG DER PHOSPHORYLIERUNG DES VP30 SERINRESTES 29 MIT HILFE EINES PHOSPHOSPEZIFISCHEN PEPTIDANTIKÖRPERS NACH REKOMBINANTER EXPRESSION

Während *wildtypisches* VP30 sechs Serinreste innerhalb der Phosphorylierungsdomäne besitzt, die im Rahmen einer EBOV-Infektion in sowohl phosphorylierter als auch unphosphorylierter Form vorliegen können, ermöglichte die Verwendung des recEBOV\_S29 eine nähere Untersuchung der dynamischen Phosphorylierung an nur einem einzigen phosphorylierbaren Serinrest. Mit Hilfe des recEBOV\_S29 sollte die Lokalisation von phosphoryliertem sowie unphosphoryliertem VP30 näher untersucht werden, und somit zum besseren Verständnis der Bedeutung der dynamischen Phosphorylierung für den viralen Lebenszyklus beitragen. In diesem Zusammenhang wurde die Herstellung eines phosphospezifischen Peptidantikörpers veranlasst. Abbildung 25A zeigt das zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzte Peptid, das auf der Sequenz des VP30\_S29 basiert und zwölf Aminosäuren umfasst. Dabei wurde sowohl ein phosphospezifischer Peptidantikörper ( $\alpha$ -pS29) als auch ein nichtphosphospezifischer Antikörper ( $\alpha$ -non pS29) generiert.

Für erste Versuche zur Spezifität der generierten phosphospezifischen Peptidantikörper wurden beide Antikörper nach rekombinanter Expression des VP30\_S29 in der Immunfluoreszenzanalyse charakterisiert (3.4.1). Dazu wurden HuH7-Zellen wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert, nach 16 h fixiert und mit Hilfe der phosphospezifischen Antikörper die phosphorylierungsabhängige Verteilung des VP30\_S29 innerhalb der Zelle analysiert. Man kann erkennen, dass sowohl phosphoryliertes VP30\_S29 als auch nichtphosphoryliertes VP30\_S29 die gleiche diffuse Verteilung aufwiesen wie VP30\_wt (vergl. Abb. 17A).

Zur weiteren Kontrolle der Spezifität der Antikörper wurden HuH7-Zellen mit Plasmiden für VP30\_wt, VP30\_AA sowie VP30\_S30 transfiziert und mittels Immunfluoreszenzanalyse charakterisiert (Abb. 25C). VP30\_wt wurde vom sowohl phosphospezifischen  $\alpha$ -pS29 als auch vom nichtphosphospezifischen  $\alpha$ -non pS29 Antikörper erkannt. Das nichtphosphorylierbare VP30\_AA konnte durch  $\alpha$ -non pS29 Antikörper nachgewiesen werden, nicht aber durch den phosphospezifischen  $\alpha$ -pS29 Antikörper. Beide Antikörper waren nicht in der Lage, VP30\_S30 zu erkennen. Zusätzlich sollte noch die VP30\_S29 Phosphorylierung nach rekombinanter Expression der Proteine im Zellysat untersucht werden. Dazu wurden HEK293-Zellen wie unter 3.2.2 beschrieben mit verschiedenen VP30-Konstrukten transfiziert und nach 48 h lysiert (3.2.3). Hierfür wurde ein spezieller Lysispuffer verwendet, der Phosphatasen inhibiert und so den Phosphorylierungsstatus eines Proteins stabilisiert. Nach SDS-PAGE und Western Blot Analyse wurden die VP30 Mutanten durch die Serin 29-spezifischen Antikörper äquivalent zur Immunfluoreszenzanalyse detektiert (3.4.2 und 3.4.3). VP30\_S29 und VP30\_wt wurden in phosphorylierter sowie unphosphorylierter Form detektiert (Abb. 25D, Spur 1 und 4).

Nichtphosphorylierbares VP30\_AA ließ sich wie in der Immunfluoreszenzanalyse nur mit dem  $\alpha$ -non pS29 Antikörper nachweisen (Abb. 25D, Spur 2). VP30\_S30 sowie das phosphomimetische VP30\_DD wurden von beiden Antikörpern nicht erkannt (Abb. 25D, Spuren 3 und 5). Die Expression der VP30 Mutanten wurde zusätzlich durch einen VP30-spezifischen Antikörper nachgewiesen (Abb. 25D, Spur 1-5,  $\alpha$ -VP30).



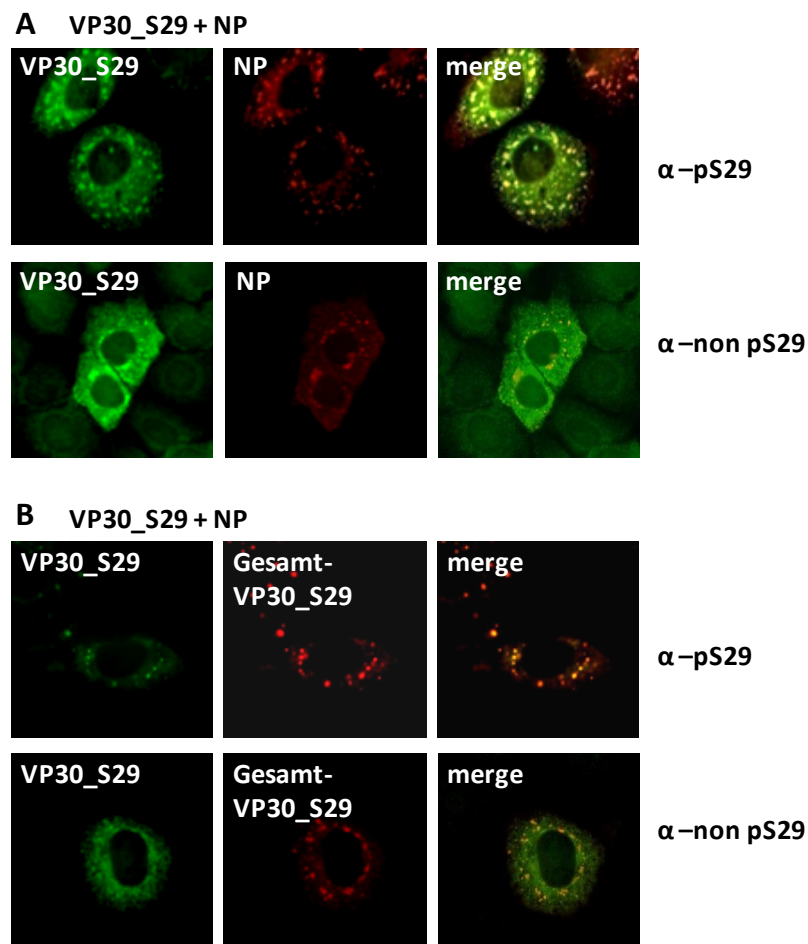
**Abbildung 25: Charakterisierung eines phosphospezifischen VP30\_S29 Peptidantikörpers nach rekombinanter Expression. A. Schematische Darstellung der generierten Peptide.** Die synthetisierten Peptide basieren auf der Sequenz des VP30\_S29 und umfassen zwölf Aminosäuren der ersten Phosphorylierungsdomäne. Das Peptid wurde mit einem nichtphosphorylierten Serinrest 29 sowie mit einem phosphorylierten Serinrest 29 synthetisiert. Nach der Immunisierung von Kaninchen wurden durch eine anschließende Aufreinigung phosphospezifische ( $\alpha$ -pS29) von nichtphosphospezifischen ( $\alpha$ -non pS29) Antikörpern separiert. **B. Detektion von rekombinant exprimiertem VP30\_S29 mittels phosphospezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenzanalyse.** HuH7-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben mit VP30\_S29 transfiziert. 48 h p.t. erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen (3.4.1). Die Detektion von VP30\_S29 erfolgte unter Verwendung von  $\alpha$ -pS29 (Kaninchen) sowie  $\alpha$ -non pS29 (Kaninchen), die mit einem  $\alpha$ -Kaninchen Alexa 488 (Ziege) nachgewiesen wurden. **C. Detektion rekombinant exprimierter VP30 Mutanten mittels phosphospezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenzanalyse.** HuH7-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben mit Plasmiden für VP30\_wt, VP30\_AA sowie VP30\_S30 transfiziert. Die Fixierung und Färbung erfolgte wie unter B. beschrieben. **D. Detektion rekombinant exprimierter VP30 Mutanten mittels phosphospezifischer Antikörper im Zellysate.** HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert. 48 h erfolgte die Lyse der Zellen (3.2.3). Anschließend wurden die Zellysate mittels SDS-PAGE (12 %) und Western Blot analysiert (3.4.2 und 3.4.3). Die phosphorylierungsabhängige Detektion von VP30 erfolgte unter Verwendung von  $\alpha$ -pS29 (Kaninchen) sowie  $\alpha$ -non pS29 (Kaninchen), die mit einem  $\alpha$ -Kaninchen IRDye 680 nm (Ziege) angefärbt wurden. Zusätzlich wurde die Expression mit einem  $\alpha$ -VP30 (Meerschweinchen) und einem  $\alpha$ -Meerschweinchen IRDye 780 nm (Ziege) nachgewiesen. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit dem LiCor Odyssey Infrared Imager.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide phosphospezifischen Antikörper ihr Zielprotein VP30\_S29 erkennen. Die Erkennung des *wildtypischen* VP30 war überraschend, weicht doch die Sequenz des Peptid-Epitops der generierten Antikörper (HVRAR-(p)**SAA**-AARENY) von der Peptidsequenz des VP30\_wt um zwei Aminosäuren ab (HVRAR-**SSS**-AARENY). Möglicherweise ist jedoch auch bei VP30\_wt der Serinrest 29 präferentiell phosphoryliert, so dass das Epitop von beiden Antikörpern erkannt werden kann. VP30\_S30 mit ähnlicher Sequenz (HVRAR-**ASA**-AARENY) zu VP30\_S29 wurde hingegen durch beide phosphospezifischen Antikörper nicht erkannt, was die Spezifität der Antikörper für den phosphorylierten Serinrest 29 unterstreicht. In diesem Zusammenhang wurde auch das VP30\_AA (HVRAR-**AAA**-AARENY) ausschließlich durch den nichtphosphospezifischen Antikörper erkannt.

VP30 co-lokalisiert in Gegenwart von NP nach rekombinanter Expression in NP-induzierten *inclusion bodies*, die in virusinfizierten Zellen als Ort der Virusvermehrung angesehen werden. Dabei findet die Konzentrierung des VP30 in diesen Einschlusskörpern abhängig von dessen Phosphorylierungsstatus statt. Während dephosphoryliertes VP30 (VP30\_AA) dort nicht ankonzentriert wird, sondern diffus im Zytoplasma verteilt bleibt, wird phosphoryliertes VP30 (VP30\_DD) in die *inclusion bodies* rekrutiert und co-lokalisiert hier mit NP. Mit Hilfe der phosphospezifischen Peptidantikörper sollte nun die Lokalisation des VP30\_S29 nach Co-Expression mit NP näher untersucht werden. Dazu wurden HuH7-Zellen mit VP30\_S29 und NP transfiziert, nach 16h fixiert und das VP30\_S29 spezifisch angefärbt (3.2.2 und 3.4.1). Phosphoryliertes VP30\_S29 ( $\alpha$ -pS29) zeigte nach Co-Expression mit NP eine Umverteilung in die NP-induzierten *inclusion bodies*, wobei ein Teil des VP30\_S29 auch diffus im Zytoplasma verteilt blieb (Abb. 26A). Ein anderes Bild zeigte sich für die Lokalisation des nichtphosphorylierten VP30\_S29 ( $\alpha$ -non pS29): Auch hier war VP30\_S29 in den NP-induzierten Einschlusskörper zu beobachten, ein Großteil des VP30\_S29 im Zytoplasma blieb jedoch diffus verteilt. Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich die Verteilung der beiden Phosphorylierungsformen des VP30\_S29 in den Einschlusskörpern unterscheidet. Es befinden sich zwar sowohl phosphoryliertes als auch nichtphosphoryliertes VP30\_S29 in den *inclusion bodies*, allerdings zeigte nichtphosphoryliertes VP30\_S29 zudem eine deutlich diffusere Verteilung im Zytoplasma.

Nach Rekrutierung und Co-Lokalisation des VP30\_S29 in NP-induzierte Einschlusskörper sollte diese phosphorylierungsabhängige Verteilung des VP30\_S29 mit der Verteilung der Gesamtpopulation des VP30\_S29 in Verbindung gebracht werden. Dazu wurde die intrazelluläre Verteilung der Gesamtpopulation von VP30\_S29 mit einem  $\alpha$ -VP30 Antikörper nachgewiesen (Abb. 26B). Es konnte eine Co-Lokalisation des phosphorylierten sowie

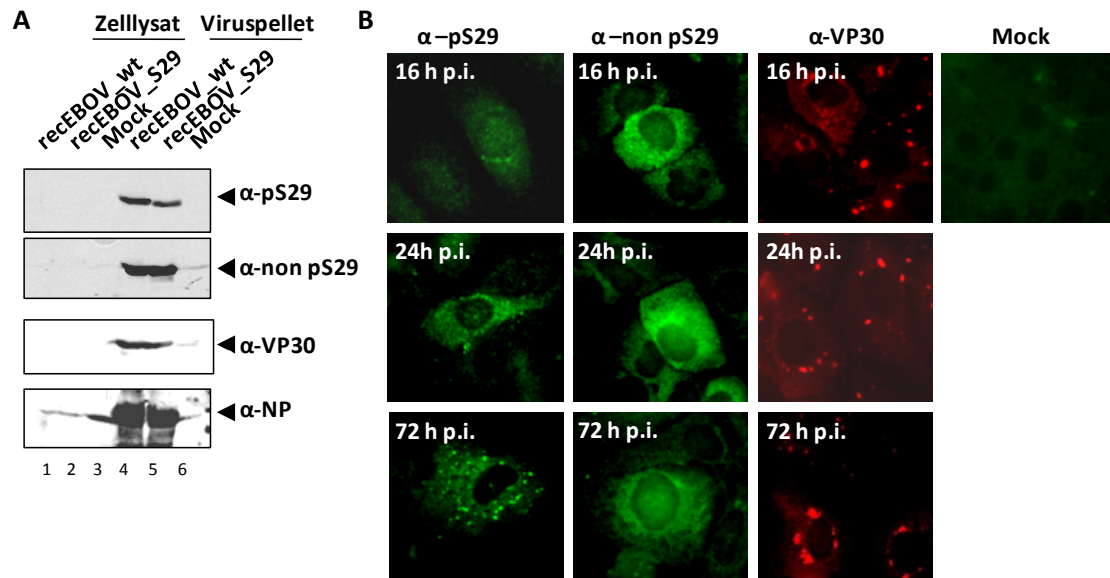
nichtphosphorylierten VP30\_S29 mit Gesamt-VP30\_S29 in *inclusion bodies* nachgewiesen werden. Das nichtphosphorylierte VP30\_S29 wies zudem eine starke zytoplasmatische Verteilung auf, die bei der Verteilung des Gesamt-VP30\_S29 nicht so deutlich ausgeprägt war. Möglicherweise erkennt der  $\alpha$ -VP30 (Meerschweinchen) Antikörper vor allem phosphoryliertes VP30, welches eher in den *inclusion bodies* ankonzentriert ist.



**Abbildung 26: Charakterisierung der Phosphorylierung des VP30\_S29 nach Co-Expression mit NP in der Immunfluoreszenzanalyse.** HuH7-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben mit Plasmiden für VP30\_S29 sowie NP transfiziert. 48 h p.t. erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen (3.4.1). **A. Detektion des phosphorylierten bzw. unphosphorylierten VP30\_S29 und NP.** Die Detektion von VP30\_S29 erfolgte unter Verwendung von  $\alpha$ -pS29 (Kaninchen) bzw.  $\alpha$ -non pS29 (Kaninchen), die mit einem  $\alpha$ -Kaninchen Alexa 488 (Ziege) angefärbt wurden. Die Expression des NP wurde durch  $\alpha$ -NP (Huhn) sowie  $\alpha$ -Huhn Rhodamin (Ziege) detektiert. **B. Detektion des phosphorylierten bzw. unphosphorylierten VP30\_S29 und Gesamt-VP30\_S29 nach Co-Expression mit NP.** Die Detektion von VP30\_S29 erfolgte unter Verwendung von  $\alpha$ -pS29 (Kaninchen) bzw.  $\alpha$ -non pS29 (Kaninchen), die mit einem  $\alpha$ -Kaninchen Alexa 488 (Ziege) angefärbt wurden. Gesamt-VP30\_S29 wurde zusätzlich durch  $\alpha$ -VP30 (Meerschweinchen) sowie  $\alpha$ -Meerschweinchen Alexa 594 (Ziege) detektiert. NP wurde nicht angefärbt.

#### 4.2.7 CHARAKTERISIERUNG DER PHOSPHORYLIERUNG DES VP30 SERINRESTES 29 IM REKOMBINANTEN EBOV\_S29

Nach erster Charakterisierung der phosphospezifischen Peptidantikörper in der rekombinanten Expression von VP30\_S29 war es äußerst interessant die phosphorylierungsabhängige Verteilung des VP30\_S29 im authentischen viralen Kontext zu untersuchen. Zunächst wurde die phosphospezifische Detektion des Serinrestes 29 von VP30 im recEBOV\_S29 sowie im recEBOV\_wt überprüft. Dazu wurden VeroE6-Zellen mit einer MOI von 1 infiziert und nach 3 Tagen der Überstand mittels Ultrazentrifugation ankonzentriert (3.3.2 und 3.3.4). Das Viruspellet wurde zusammen mit einem Aliquot des Zelllysates einer SDS-PAGE und anschließend Western Blot unterzogen und mit den phosphospezifischen Antikörpern gefärbt (3.2.3, 3.4.2 und 3.4.3). In Präparationen des recEBOV\_S29 und des recEBOV\_wt wurden VP30\_S29 und VP30\_wt von  $\alpha$ -pS29 sowie  $\alpha$ -non pS29 erkannt (Abb.27A, Spur 4, 5). Es wurde also die phosphorylierte und nichtphosphorylierte Form des VP30 Serinrestes 29 in die rekombinanten Viren inkorporiert. Zur Kontrolle wurden die Viruspräparationen auch mit einem Meerschweinchen  $\alpha$ -VP30 Antikörper und einem  $\alpha$ -NP Antikörper analysiert. Ebenso wurden die Lysate der infizierten Zellen mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (3.4.2 und 3.4.3). Im Zelllysat wurde VP30\_S29 bzw. VP30\_wt durch die beiden phosphospezifischen Antikörper nicht detektiert (Abb. 27A, Spur 1 und 2). Möglicherweise waren hier bereits viele Zellen durch die Infektion aus dem Zellverband herausgelöst und damit der Detektion entzogen, denn auch NP konnte im Zelllysat nicht nachgewiesen werden. Die phosphorylierungsabhängige Lokalisation des VP30\_S29 sollte anschließend mittels Immunfluoreszenzanalysen untersucht werden. HuH7-Zellen wurden dazu mit einer MOI von 1 mit recEBOV\_S29 infiziert und 16, 24 oder 72 h p.i. einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen (3.3.4 und 3.4.1). Abbildung 27B zeigt die Verteilung von phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem VP30\_S29 nach Infektion mit dem recEBOV\_S29. Phosphoryliertes VP30 ( $\alpha$ -pS29) befand sich zu frühen Zeitpunkten (16 h p.i.) häufig diffus im Zytoplasma verteilt, 24 und 72 h p.i. konnte man Akkumulationen des phosphorylierten VP30\_S29 in *inclusion bodies* finden. Nichtphosphoryliertes VP30\_S29 ( $\alpha$ -non pS29) zeigte zu jedem Zeitpunkt nach der Infektion mit recEBOV\_S29 eine diffuse Verteilung im Zytoplasma. Zum Vergleich wurde außerdem Gesamt-VP30\_S29 durch einen VP30-spezifischen Meerschweinchen Antikörper angefärbt, das sich ebenfalls hauptsächlich viralen Einschlusskörpern findet.

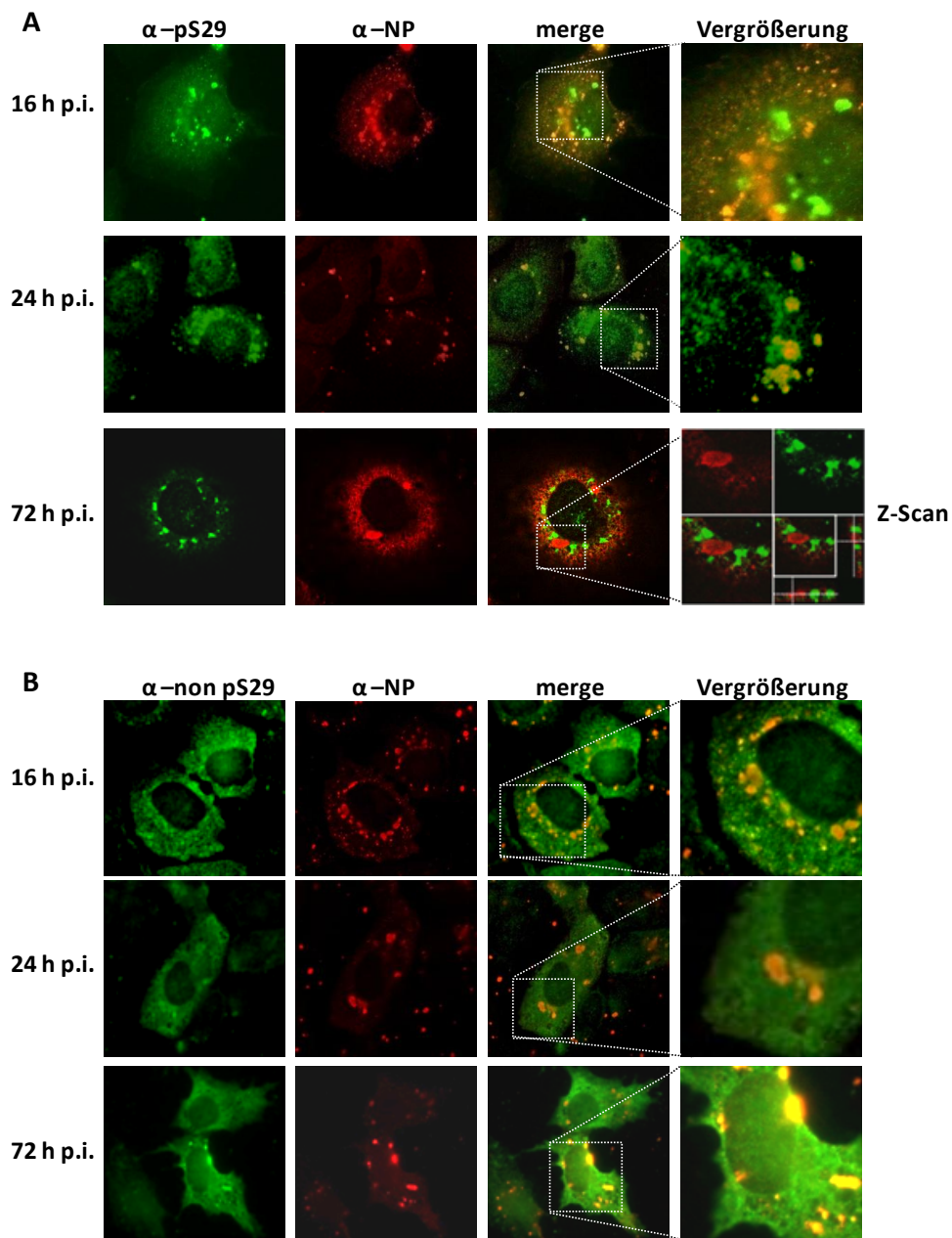


**Abbildung 27: Charakterisierung der phosphospezifischen VP30\_S29 Peptidantikörper nach Infektion mit recEBOV\_S29. A. Phosphospezifische Detektion des VP30\_S29.** VeroE6-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit recEBOV\_S29 oder recEBOV\_wt mit einer MOI von 1 infiziert. 72 h p.i. erfolgte die Aufreinigung und Ankonzentrierung der Viren (3.3.2). Zusätzlich wurden die Zellen wie unter 3.2.3 beschrieben lysiert. Die inaktivierten Proben wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE (12 %) und Western Blot analysiert (3.4.2 und 3.4.3). Die phosphorylierungsabhängige Detektion von VP30\_S29 erfolgte unter Verwendung von α-pS29 (Kaninchen) sowie α-non pS29 (Kaninchen), die mit einem α-Kaninchen IRDye 680 nm (Ziege) angefärbt wurden. Zusätzlich wurde VP30 mit einem α-VP30 (Meerschweinchen) und einem α-Meerschweinchen IRDye 780 nm (Ziege) Antikörper nachgewiesen sowie NP mittels α-NP (Huhn) und einem α-Huhn IRDye 780 nm (Ziege) Antikörper. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit dem LiCor Odyssey Infrared Imager. **B. Detektion des VP30\_S29 mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenzanalyse.** HuH7-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit recEBOV\_S29 mit einer MOI von 1 infiziert. Die Zellen wurden 16, 24 oder 72 h p.i. fixiert und gefärbt (3.4.1). Die Detektion von VP30\_S29 erfolgte unter Verwendung von α-pS29 (Kaninchen) sowie α-non pS29 (Kaninchen), die mit einem α-Kaninchen Alexa 488 (Ziege) nachgewiesen wurden. Als Kontrolle wurde VP30\_S29 mit einem α-VP30 (Meerschweinchen) und einem α-Meerschweinchen Alexa 594 (Ziege) Antikörper nachgewiesen.

Im Folgenden wurde die phosphorylierungsabhängige Verteilung des VP30\_S29 in einer Doppelfärbung mit NP untersucht, welches die viralen *inclusion bodies* markiert. Dazu wurden Zellen wie bereits unter Abbildung 27 beschrieben mit recEBOV\_S29 infiziert und fixiert (Abb. 28). Häufig ließ sich eine Co-Lokalisation von VP30\_S29 und NP in *inclusion bodies* feststellen. In einzelnen Zellen konnte man allerdings zusätzlich phosphoryliertes VP30\_S29 in kleinen Einschlusskörpern beobachten, die nicht mit NP co-lokalisierten. Vielmehr gruppierte sich diese Subpopulation des phosphorylierten VP30\_S29 im perinukleären Bereich um die NP Einschlusskörper herum (Abb. 28A). Diese Beobachtung ließ sich für sowohl frühe als auch späte Zeitpunkte nach der Infektion feststellen. 72 h p.i. wurden die separaten *inclusion bodies*, die entweder VP30\_S29 oder NP enthielten mittels konfokaler Mikroskopie nachgewiesen (Abb. 28A, Z-Scan). Die Detektion des nichtphosphorylierten VP30\_S29 ergab ebenfalls eine Co-Lokalisation des Proteins mit NP in den viralen Einschlusskörpern (Abb. 28B).

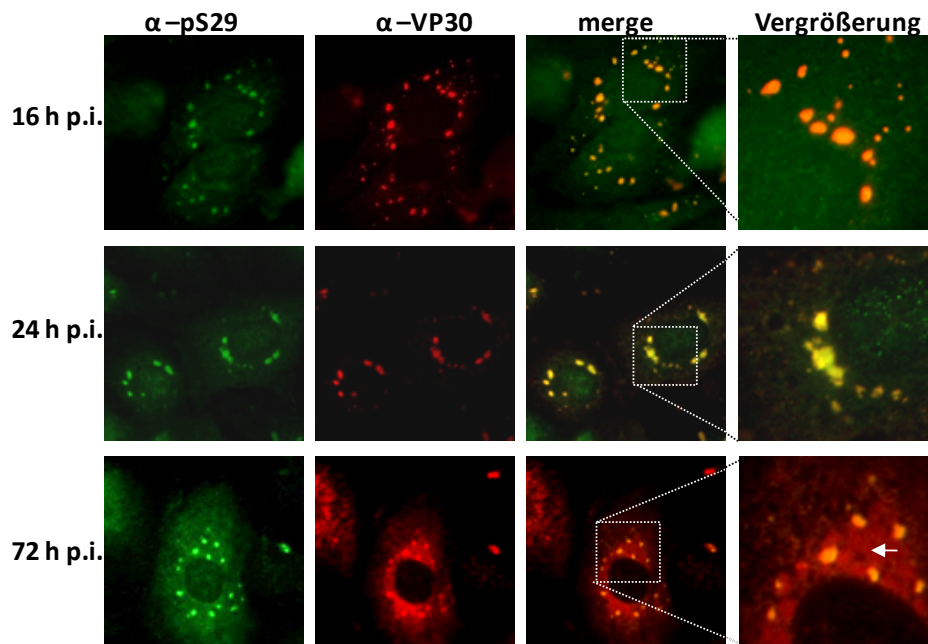


Allerdings befand sich weiterhin ein großer Teil des nichtphosphorylierten VP30\_S29 außerhalb der *inclusion bodies* diffus im Zytoplasma.



**Abbildung 28: Lokalisation von VP30\_S29 und NP in viralen Einschlusskörpern. A. Lokalisation des phosphorylierten VP30\_S29 mit NP in viralen Einschlusskörpern.** HuH7-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit recEBOV\_S29 mit einer MOI von 1 infiziert. Die Zellen wurden 16, 24 oder 72 h p.i. fixiert und gefärbt (3.4.1). Die Detektion von phosphoryliertem VP30\_S29 erfolgte unter Verwendung von  $\alpha$ -pS29 (Kaninchen) sowie einem  $\alpha$ -Kaninchen Alexa 488 (Ziege). NP wurde mit einem  $\alpha$ -NP (Huhn) und einem  $\alpha$ -Huhn Rhodamin (Ziege) Antikörper nachgewiesen. Die Aufnahme 72 h p.i. wurde mit Hilfe eines Konfokalen Mikroskops analysiert (unter Anleitung von Gordian Schudt), um die Einschlusskörper näher zu charakterisieren. **B. Lokalisation des nichtphosphorylierten VP30\_S29 mit NP in viralen Einschlusskörpern.** Die Lokalisierung des nicht-phosphorylierten VP30\_S29 erfolgte nach Färbung mit  $\alpha$ -non pS29 (Kaninchen) und  $\alpha$ -Kaninchen Alexa 488 (Ziege), die des NP wie unter A. beschrieben.

Interessant war weiterhin zu untersuchen, inwieweit sich die bisher beobachteten Akkumulationen des phosphorylierten VP30\_S29 möglicherweise auch innerhalb der Gesamt-VP30\_S29 Population abgrenzen. Dazu wurden die mit recEBOV\_29 infizierten HuH7-Zellen zusätzlich mit einem VP30-spezifischen Antikörper aus Meerschweinchen angefärbt, um die Verteilung des phosphorylierten VP30\_S29 in Zusammenhang zur Gesamtverteilung des VP30\_S29 zu bringen (Abb. 29).

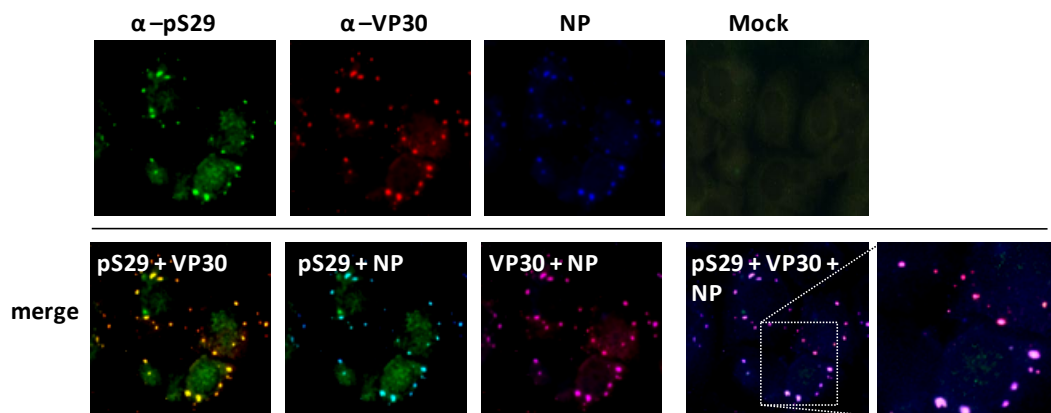


**Abbildung 29: Lokalisation des phosphorylierten VP30\_S29 und des Gesamt-VP30\_S29 in viralen Einschlusskörpern.** HuH7-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit recEBOV\_29 mit einer MOI von 1 infiziert. Die Zellen wurden 16, 24 oder 72 h p.i. fixiert und gefärbt (3.4.1). Die Detektion von phosphoryliertem VP30\_S29 erfolgte unter Verwendung von  $\alpha$ -pS29 (Kaninchen) sowie einem  $\alpha$ -Kaninchen Alexa 488 (Ziege). Gesamt-VP30\_S29 wurde mit einem  $\alpha$ -VP30 (Meerschweinchen) und einem  $\alpha$ -Meerschweinchen 594 (Ziege) Antikörper nachgewiesen.

Phosphoryliertes VP30\_S29 co-lokalisierte wie zu erwarten mit Gesamt-VP30\_S29 in viralen Einschlusskörpern. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass phosphoryliertes VP30\_S29 nicht in allen VP30\_S29-positiven Einschlusskörpern enthalten war. Im Gegensatz zur Co-Färbung mit NP ließ sich dies allerdings nur zu späteren Zeitpunkten (72 h p.i.) nach der Infektion beobachten. Die Färbung des nichtphosphorylierten VP30\_S29 durch den  $\alpha$ -non pS29 Antikörper war in dieser Kombination sehr schwach und ließ daher keine eindeutige Auswertung zu. Möglicherweise ist während der Infektion nur wenig nichtphosphoryliertes VP30\_S29 vorhanden, zudem ist die Signalstärke eines diffus verteilten Proteins im Vergleich zu einem punktförmig konzentrierten Protein deutlich schwächer.

Phosphoryliertes VP30\_S29 war in viralen Einschlusskörpern nachweisbar und fand sich außerdem auch außerhalb der NP-Einschlusskörper im Zytoplasma konzentriert. Interessant

war es daher, die Verteilung des phosphorylierten VP30\_S29 in den viralen Einschlusskörpern bei gleichzeitiger Färbung der VP30\_S29-Gesamtpopulation sowie des NP zu untersuchen.



**Abbildung 30: Färbung des phosphorylierten VP30\_S29, Gesamt-VP30 sowie NP in viralen Einschlusskörpern.** HuH7-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit recEBOV\_S29 mit einer MOI von 1 infiziert. Die Zellen wurden 16 h p.i. fixiert und gefärbt (3.4.1). Die Detektion von phosphoryliertem VP30\_S29 erfolgte unter Verwendung von  $\alpha$ -pS29 (Kaninchen) sowie einem  $\alpha$ -Kaninchen Alexa 488 (Ziege). Gesamt-VP30 wurde mit einem  $\alpha$ -VP30 (Meerschweinchen) und einem  $\alpha$ -Meerschweinchen 594 (Ziege) Antikörper nachgewiesen und NP mit einem  $\alpha$ -NP (B6C5, Maus) und einem  $\alpha$ -Maus AMCA (Pferd).

Es ließ sich eine Co-Lokalisation von VP30\_S29 und NP in den viralen *inclusion bodies* nach Dreifachfärbung (weiße *inclusion bodies*) detektieren (Abb. 30). Werden die Bilder, die mit zwei Frequenzen erhalten wurden, separat analysiert, so findet man für phosphoryliertes VP30\_S29 eine Co-Lokalisation mit Gesamt-VP30\_S29 (gelbe *inclusion bodies*) und ebenso für VP30 und NP (lila *inclusion bodies*). Für phosphoryliertes VP30\_S29 konnte keine eigenständige Subpopulation außerhalb der NP *inclusion bodies* nachgewiesen werden (vergl. Abb. 28A). Hier zeigte sich ebenfalls eine Co-Lokalisation (blaugrüne *inclusion bodies*). Allerdings schienen einige *inclusion bodies*, die NP und Gesamt-VP30\_S29 enthielten, kein oder kaum phosphoryliertes VP30\_S29 zu enthalten (Vergrößerung lila *inclusion bodies*).

Mit Hilfe der phosphospezifischen VP30\_S29 Antikörper ließ sich nachweisen, dass in den viralen Einschlusskörpern hauptsächlich phosphoryliertes VP30\_S29 ankonzentriert wird, wo es mit NP co-lokalisiert. Außerdem konnte beobachtet werden, dass sich in einzelnen Zellen ein geringer Anteil des phosphorylierten VP30\_S29 außerhalb der *inclusion bodies* befand und perinukleär akkumulierte. Diese Einschlusskörper wurden vor allem zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion gefunden. Es ist daher nicht eindeutig, ob es sich dabei um Strukturen handelt, die aufgrund der Infektion in den Zellen gebildet werden und die möglicherweise Degradationsprodukte darstellen. Weitere Studien mit den phosphospezifischen VP30\_S29 Antikörpern werden folgen, um die limitierte Phosphorylierung des Serinestes 29 näher zu charakterisieren und spezifizieren.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 DIE ROLLE DER PHOSPHORYLIERUNG DES VP30 FÜR DEN ÜBERGANG VON VIRALER TRANSKRIPTION ZU VIRALER REPLIKATION

Die Phosphorylierung stellt eine häufige post-translationale Modifikation viraler Nukleokapsidproteine dar. Die stark phosphorylierten P-Proteine von Vertretern der Ordnung *Mononegavirales* agieren zusammen mit dem Nukleoprotein und der Polymerase L als essentielle Faktoren für virale Transkription und Replikation (60). Dabei ist die Funktion der Phosphorylierung der P-Proteine nicht immer eindeutig geklärt. Filoviren stellen in diesem Zusammenhang eine Ausnahme dar. Sie besitzen neben einem kaum phosphorylierten P-Homolog, dem VP35, zusätzlich noch ein viertes Nukleokapsidprotein, das VP30. Im Gegensatz zu VP35 wird VP30 stark phosphoryliert und durch die Phosphorylierung in seiner Aktivität reguliert. Die Transkriptions-aktivierende Funktion des VP30 wird über die Phosphorylierung von zwei N-terminal gelegenen Serinclustern reguliert. Schwach oder nichtphosphoryliert ist VP30 ein essentieller EBOV-spezifischer Transkriptionsaktivator, während die vollständige Phosphorylierung der Serincluster in einem Transkriptions-inaktiven Protein resultiert. Im Gegensatz zur Transkription ist das VP30 für die Replikation von EBOV nicht essentiell (85, 139, 144). Allerdings ist unklar, ob die Phosphorylierung des VP30 über die Regulation der viralen Transkription Einfluss auf die Replikation nimmt oder sogar als Schalter agiert, der innerhalb des viralen Replikationszyklus den Übergang von Transkription zu Replikation reguliert.

#### ***Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf Transkription und Replikation***

Mit Hilfe von VP30-Substitutionsmutanten, die entweder ein dephosphoryliertes VP30 (VP30\_AA) oder ein permanent phosphoryliertes VP30 (VP30\_DD) imitieren, konnte eine positive Korrelation zwischen Phosphorylierung des VP30 und viraler Replikation festgestellt werden. Die Replikation eines EBOV-spezifischen Minigenoms war in Zellen erhöht, wenn VP30 phosphoryliert war (VP30\_DD) (ca. 174 %, s. 4.1.3). Auch wurde in Gegenwart von VP30\_DD mehr repliziertes Minigenom in iVLPs inkorporiert als in Gegenwart von VP30\_wt. Genau umgekehrt verhielt es sich mit einem dephosphorylierten VP30 (VP30\_AA). Dieses aktivierte zwar wie erwartet die virale Transkription, die virale Replikation war aber im Vergleich zu VP30\_wt reduziert (ca. 74 %). Der verminderte Einbau von replizierten Minigenomen in iVLPs war in Gegenwart von VP30\_AA nicht nachzuweisen. Möglicherweise sind geringe inhibitorische Effekte nur schwer zu detektieren, da die Anzahl an freigesetzten iVLPs, die ein Minigenom inkorporiert haben, insgesamt sehr gering ist. Außerdem wird wahrscheinlich auch

das durch die T7-Polymerase synthetisierte Template direkt und ohne den Zwischenschritt der Replikation in iVLPs verpackt und könnte daher geringe Abweichungen hinsichtlich des Einbaus durch den Nukleokapsidkomplex replizierter Minigenome maskieren (85). Zum Nachweis der viralen Replikation wurde die von Hoenen et al. publizierte Methode der quantitativen Strang-spezifischen qPCR verwendet (85) und erweitert, indem eine sequenzspezifische Sonde anstelle des unspezifischen Interkalators SYBR Green eingesetzt wurde. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des VP30 und dessen Phosphorylierung auf die virale Replikation im Rahmen eines iVLP-Assays und nicht im Kontext eines klassischen Minigenomassays (nur NP, VP35, L, VP30, MG und T7 vorhanden) untersucht. Im iVLP-Assay sind alle viralen Proteine vorhanden, so dass hier ein authentisches System repräsentiert wird.

Die hier präsentierten Daten konnten kürzlich durch Ergebnisse von Martinez et. al bestätigt werden (126). Hier wurden die VP30 Phosphorylierungsmutanten VP30\_AA und VP30\_DD rekombinant in Zellen exprimiert und diese anschließend mit *wildtypischen* EBOV infiziert. Wurde VP30\_DD exprimiert, war die virale Replikation im Vergleich zu VP30\_wt erhöht (140 %), während sie in Gegenwart von VP30\_AA reduziert (84 %) war. Dies weist darauf hin, dass sich die Transkription negativ auf die Replikation auswirkt. Umgekehrt beeinflusst die Replikation die Transkription indirekt positiv, da mehr Templates für die Transkription zur Verfügung stehen.

Eine permanente negative Ladung an der VP30 Phosphorylierungsdomäne (repräsentiert durch VP30\_DD) besaß einen inhibitorischen Einfluss auf die Transkriptionsaktivierung durch *wildtypisches* VP30 (4.1.2). Der inhibitorische Effekt war allerdings nicht stark ausgeprägt und relativierte sich bei höheren Konzentrationen von VP30\_DD. Die Interaktion von VP30\_wt mit VP30\_DD wurde in der Co-Immunpräzipitation durch die permanente Ladung des VP30\_DD nicht beeinträchtigt; dies spricht für die Ausbildung heterooligomerer VP30-Hexamere, die möglicherweise die virale Transkription nicht unterstützen. Es ist nicht auszuschließen, dass VP30\_DD in höheren Konzentrationen besser mit sich selbst interagieren kann. Auch die zu späten Zeitpunkten nach der Infektion beobachteten Akkumulationen des phosphorylierten VP30\_S29, die sich außerhalb der NP *inclusion bodies* befanden, weisen daraufhin, dass phosphoryliertes VP30 wahrscheinlich bei hohen Konzentrationen besser mit sich selbst interagieren kann (4.2.7). Dementsprechend würde VP30\_DD Homooligomere ausbilden, die zwar negativ, aber nicht dominant negativ sind. Auf diese Weise würden mehr *wildtypische* VP30-Hexamere für die Transkription zur Verfügung stehen. Ein ähnlicher konzentrationsabhängiger Effekt wurde bereits für die Funktion des Transkriptionsfaktors TyrR bei Bakterien beschrieben. Hier ist die Ausbildung von Dimeren (transkriptionsaktiv) und

Hexameren (transkriptions-inhibierend) ebenfalls abhängig von der Konzentration des Transkriptionsfaktors (47, 222).

Alternativ könnte das Transkription/Replikations-Gleichgewicht in den VLP-Synthesezellen bei gleichzeitiger Anwesenheit eines *wildtypischen* VP30 und eines permanent phosphorylierten VP30 zugunsten der viralen Replikation verschoben werden. In Abhängigkeit der Konzentration des phosphorylierten VP30 würde die Replikation verstärkt, gleichzeitig stünden aber auch mehr Templates für die virale Transkription zur Verfügung. Auf diese Weise könnte ein dominant negativer Effekt eines permanent phosphorylierten VP30 auf die Transkription maskiert werden. Um dies zu überprüfen, wäre es interessant, die Menge replizierten Minigenoms bei gleichzeitiger Anwesenheit von VP30\_wt und VP30\_DD zu untersuchen und so einen möglicherweise konzentrationsabhängigen Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf den Übergang Transkription/Replikation nachzuweisen.

#### ***Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die Assoziation mit den Nukleokapsidproteinen***

Die Phosphorylierung des VP30 besaß einen Einfluss auf die Transkription und auf die Replikation von EBOV, obwohl das Protein für die Replikation eigentlich nicht benötigt wird. Daher stellte sich die Frage, ob die Phosphorylierung des VP30 den Übergang von viraler Transkription zu Replikation reguliert und welcher Mechanismus dieser Regulation zu Grunde liegt. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die Interaktion mit den viralen Nukleokapsidproteinen untersucht (4.1.4 bis 4.1.7). Dabei wurde erstmals eine direkte Interaktion des VP30 mit VP35 mit Hilfe zweier unabhängiger Methoden nachgewiesen. Interessanterweise korrelierte diese Interaktion mit dem Phosphorylierungsstatus des VP30. So interagierte VP30\_AA ( $\triangleq$  dephosphoryliertes VP30) verstärkt mit VP35, während VP30\_DD ( $\triangleq$  phosphoryliertes VP30) dazu deutlich schlechter in der Lage war. Die Bedeutung des N-Terminus des VP30 für die Interaktion mit dem VP35 konnte zudem mit einer VP30 Deletionsmutante bestätigt werden. Möglicherweise bewirkt die Interaktion von VP30 und VP35, dass das VP30 über VP35 in den Polymerasekomplex rekrutiert wird.

Innerhalb der Ordnung *Mononegavirales* besitzt neben den *Filoviridae* einzig das Respiratorische Synzytialvirus (RSV, *Paramyxoviridae*) ein viertes Nukleokapsidprotein. Das M2-1 ist ein Homolog des EBOV VP30 mit ähnlichen Eigenschaften und Funktionen, für welches ebenfalls eine phosphorylierungsabhängige Interaktion mit dem P-Protein (Polymerase Co-Faktor) gezeigt wurden (38, 42, 51, 74). Allerdings ist hier nicht der Phosphorylierungsstatus des M2-1 für die Interaktion verantwortlich sondern der des P-Proteins (198). Wird das P-Protein phosphoryliert, so ist die Interaktion mit M2-1 verringert und gleichzeitig kann M2-1 seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht mehr ausüben (7, 131,

198). Die Phosphorylierung des P-Proteins resultiert daher im Ausschluss des M2-1 aus dem Polymerasekomplex, der zum Replikasekomplex modifiziert wird. Die Dephosphorylierung des P-Proteins ist im Gegensatz dazu essentiell für die Interaktion mit dem M2-1, welches auf diesem Weg in den Polymerasekomplex integriert wird, so dass nun die virale Transkription initiiert werden kann. Die Phosphorylierung des EBOV VP30 besitzt möglicherweise einen ähnlichen Einfluss auf die Modulation von Transkription/Replikation durch die phosphorylierungsabhängige Interaktion mit VP35. Zwar ist das eigentliche P-Protein Homolog bei EBOV das VP35, jedoch könnte bei EBOV die Phosphorylierung des VP30 die Komposition des jeweiligen Polymerasekomplexes dirigieren.

Für REBOV wurde bereits eine Interaktion des VP30 mit der Polymerase L beschrieben, allerdings beruhen diese Studien auf Immunfluoreszenzanalysen (72). Eine direkte Interaktion beider Proteine mittels Co-Immunpräzipitation konnte aufgrund der mangelhaften Expression der L-Polymerase hier nicht nachgewiesen werden. Ebenso wenig gelang im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Nachweis der Interaktion des ZEBOV VP30 mit der Polymerase L durch Co-Immunpräzipitation. Die Expression des L Proteins war trotz Verwendung unterschiedlicher Epitop-markierter Konstrukte nicht möglich. Es ist daher unklar, ob VP30 wirklich in der Lage ist, L zu binden, oder die Interaktion mit der Polymerase über VP35 vermittelt wird, wie bereits für NP gezeigt wurde (159, 199).

Vermutlich ist die Expression von L aufgrund der Instabilität der Polymerase schwierig. Im Komplex mit VP35 lässt sich eine Expression von L hingegen gut nachweisen (199). Eine Interaktionsstudie mit L, das durch die gleichzeitige Expression von VP35 stabilisiert wird, und einer VP30 Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, mit VP35 zu interagieren, könnte vermutlich zum besseren Verständnis der Interaktion von VP30 mit L beitragen.

Die Interaktion von VP30 mit NP wurde von der Phosphorylierung des VP30 positiv beeinflusst. Während NP und VP30\_AA eine mit VP30\_wt vergleichbare Interaktion aufwiesen, interagierte VP30\_DD verstärkt mit NP. Diese verstärkte Interaktion mit NP konnte bereits mit anderen nicht quantitativen Methoden in früheren Arbeiten beobachtet werden, da die Phosphorylierung des VP30 Auswirkungen auf die zytoplasmatische Lokalisation des VP30 besitzt. So wird phosphoryliertes VP30 (VP30\_DD) in NP-induzierten *inclusion bodies* stark ankonzentriert, während dephosphoryliertes VP30 (VP30\_AA) diffus im Zytoplasma verteilt ist und nur gering in den Einschlusskörpern akkumuliert ist (139). Inwieweit sich die verstärkte Interaktion eines phosphorylierten VP30 (VP30\_DD) mit NP auch auf die Inkorporation des

VP30 in iVLPs auswirkt, ist unklar. Zwar werden sowohl VP30\_AA als auch VP30\_DD in iVLPs eingebaut, jedoch wurde der Einbau bisher nicht quantifiziert (128).

Interessanterweise konnte mit Hilfe einer VP30 Mutante, deren Fähigkeit zur Interaktion mit NP zerstört ist (VP30\_E197A), demonstriert werden, dass die Interaktion zwischen VP30 und NP für die Transkriptionsaktivierung durch VP30 nicht benötigt wird. Außerdem scheint die fehlende Interaktion keinen Einfluss auf die Replikation des Minigenoms zu besitzen und ist nicht für die Templatefunktion des verpackten Minigenoms entscheidend (4.1.6). Die Interaktion beider Proteine ist allerdings essentiell für die Inkorporation des VP30 in iVLPs und damit für die Anwesenheit von VP30 in neu infizierten Zellen, wo es für die Transkription benötigt wird.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung des EBOV VP30 einen regulatorischen Einfluss auf die virale Transkription und Replikation besitzt. In Gegenwart von phosphoryliertem VP30 war die virale Transkription minimiert und Replikation favorisiert, umgekehrt war die Replikation reduziert und die Transkription verstärkt, wenn VP30 dephosphoryliert war. Gleichzeitig konnte eine phosphorylierungsabhängige Interaktion des VP30 mit VP35 nachgewiesen werden, die einen möglichen Mechanismus der Regulation von viraler Transkription und Replikation präsentiert. Dephosphoryliertes VP30 interagiert verstärkt mit VP35, so dass die Rekrutierung des VP30 in den Transkriptasekomplex bewirkt wird. Wird VP30 phosphoryliert, so kommt es aufgrund der schwächeren Interaktion mit VP35 zur Dissoziation des VP30 aus dem Polymerasekomplex, der nun die Replikation des viralen Genoms initiieren kann.

## **5.2 DIE ROLLE DER DYNAMISCHEN PHOSPHORYLIERUNG DES SERINREST 29 FÜR DEN VIRALEN LEBENSZYKLUS**

Aus früheren Arbeiten mit Phosphataseinhibitoren ging bereits hervor, dass der Prozess der VP30 Phosphorylierung nicht statisch ist und eine Dynamik der Phosphorylierung für den viralen Lebenszyklus erforderlich ist. Die Blockade zellulärer VP30-spezifischer Phosphatasen führte zu einer starken Phosphorylierung des VP30 und gleichzeitig zu einem Stopp der viralen Transkription (139). Ebenso konnte in eigenen Arbeiten gezeigt werden, dass zwar VP30\_AA die Transkription in späteren Phasen des viralen Lebenszyklus unterstützt, wenn die zelluläre Konzentration an viralen Proteinen hoch ist, für die Initiation der Primären Transkription wird jedoch eine Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Serinreste benötigt. VP30\_AA ist in der Primären Transkription ebenso wenig aktiv wie permanent negativ geladenes VP30\_DD (23).



Die Bedeutung einer dynamischen Phosphorylierung des VP30 für den viralen Replikationszyklus konnte in der vorliegenden Arbeit durch Studien mit recEBOV belegt werden. So war die Generierung eines recEBOV\_AA, welches keinerlei Phosphoakzeptorstellen besitzt, nicht möglich (128). In Analogie zu den iVLP-Studien konnte nur dann recEBOV hergestellt werden, wenn phosphorylierbare Serinreste innerhalb der VP30 Phosphorylierungsdomäne zur Verfügung standen (126). Auch eine permanente negative Ladung ergab kein replikationsfähiges recEBOV.

Die Dynamik der Phosphorylierung besitzt auch bei P-Proteinen von Borna- und Rhabdoviren eine essentielle Bedeutung für die Generierung von rekombinanten Viren. So war die Generierung von rekombinanten Viren nicht möglich, wenn nichtphosphorylierbare Alaninreste zur Verfügung stand, obwohl diese P-Protein Mutanten ähnlich wie *wildtypisches* P-Protein die Polymeraseaktivität im Minireplikon System unterstützten (13, 14, 46, 87, 175). Auch hier ließen sich nur dann rekombinante Viren herstellen, wenn phosphorylierbare Serinreste zur Verfügung standen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Phosphorylierung einzelner Serinreste auf die Primäre Transkription näher untersucht. Dazu wurden VP30 Einzelerinmutanten hergestellt und hinsichtlich ihrer Transkriptionsaktivität im iVLP-Assay untersucht (4.2.1). War ausschließlich Serinrest 29 innerhalb des VP30 vorhanden, wurde die Primäre Transkription aktiviert. Alle anderen VP30 Einzelerinmutanten konnten die Primäre Transkription nicht unterstützen. Dieser Befund wurde dadurch unterstützt, dass die mögliche dynamische Phosphorylierung des Serinrestes 29 ausreichte, um ein recEBOV\_S29 zu generieren. RecEBOV\_29 wies nur geringe Unterschiede im Vergleich zu einem *wildtypischen* recEBOV auf. Zwar war recEBOV\_S29 in seinem anfänglichen Wachstumsverhalten leicht attenuiert, konnte dies aber im Verlauf der Infektion wieder kompensieren. Hinsichtlich der Morphologie der Viren und ihrer Plaquebildung zeigten sich keine Unterschiede.

Die Phosphorylierung des VP30\_S29 war zwar ausreichend, um ein recEBOV zu generieren; nichtsdestotrotz scheint die Phosphorylierung dieses Serinrestes nicht essentiell für den viralen Lebenszyklus zu sein. Eigene frühere Arbeiten mit VP30 Phosphorylierungsmutanten im Kontext eines iVLP-Assays zeigten, dass auch VP30 Mutanten, deren erstes Serincluster (inkl. S29) nicht phosphorylierbar war, die Primäre Transkription unterstützten, wenn das zweite Serincluster vorhanden war (23). Eine dynamische Phosphorylierung des zweiten Serinclusters schien daher ebenso ausreichend für die Transkriptionsaktivierung. Kürzlich gewonnene Erkenntnisse unterstützen diese Daten: So war auch die Generierung eines recEBOV möglich, wenn ausschließlich die Serinreste des zweiten Serinclusters vorhanden waren (126). Das

bedeutet, dass der dynamischen Phosphorylierung und der damit einhergehenden Ladungsverteilung im Bereich beider Serincluster des VP30 eine essentielle Bedeutung für die Funktion zukommt. Steht nur ein Serinrest für die Phosphorylierung zur Verfügung, so muss dieser an Position 29 lokalisiert sein. Die Generierung eines replikationsfähigen recEBOV mit Serinrest 30 als einziger Phosphoakzeptorstelle innerhalb des VP30 war hingegen nicht möglich. Nur mit Hilfe von VP30\_wt konnte die initiale Synthese des mutierten Genoms eingeleitet werden, so dass recEBOV\_S30 produziert werden konnte. Das mit Hilfe des VP30\_wt produzierte recEBOV\_S30 war zunächst deutlich attenuiert, allerdings relativierten sich die Unterschiede in weiteren Passagen (ab Passage 3). Dies konnte durch das Auftreten von Mutationen erklärt werden, die kompensatorisch im Bereich der VP30 Phosphorylierungsstellen auftraten (4.2.5). So trat eine Reversion des Alaninrestes 29 (GCA) zu Serin (TCA) auf, was die Bedeutung des Serinrestes an Position 29 unterstreicht. Weiterhin wurde eine Mutation von Arginin 32 zu Serin identifiziert. Bei näherer Charakterisierung der Mutationen fiel auf, dass jeweils nur ein einziger Nukleotidaustausch die Aminosäureaustausche bewirkt hatte. Vermutlich war dieser Austausch der einfachste Weg für das Virus an diesen Positionen eine dynamische negative Ladung zu erzeugen und diese zu selektionieren. Interessanterweise traten die Reversion und Mutation bereits nach der dritten Passage auf. Inwiefern bei den hier beschriebenen Virusmutanten außer den Mutationen innerhalb des VP30 Gens auch andere Gene von Mutationen betroffen sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Mit Hilfe der gewählten Klonierungsstrategie und anschließender Sequenzierung sollten die aufgetretenen Mutationen quantifiziert werden. Bei ungefähr der Hälfte aller analysierten Proben fand sich eine Reversion des A29S und bei allen analysierten Proben fand sich die Mutation an Position R32S. Die aufgetretenen Mutationen und deren Selektion innerhalb weniger Replikationszyklen unterstreichen die Bedeutung der VP30 Phosphorylierung an Position 29 für die Vermehrung des EBOV.

Wahrscheinlich spielt die Phosphorylierung des Serinrest 30 innerhalb des ersten Serinclusters keine entscheidende Rolle für den viralen Replikationszyklus. Identifiziert man mit Hilfe von *in silico* Analysen mögliche Kinase-Kandidaten (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw>), so zeigt sich, dass Serinrest 30 im Gegensatz zu Serinrest 29 (Proteinkinase G) und Serinrest 31 (Casein Kinase I) kein Erkennungsmotiv für bisher bekannte Kinasen besitzt. Zudem ist Serinrest 30 innerhalb der EBOV Spezies nicht konserviert: bei REBOV findet man an dieser Position ein Isoleucin, bei SEBOV ein Leucin. Serinrest 30 scheint also für die Phosphorylierung des ersten Serinclusters keine entscheidende Rolle zu spielen.

Die erfolgreiche Generierung eines recEBOV mit Phosphorylierung ausschließlich an Position S29 bot die Möglichkeit, die Verwendung dieser Phosphorylierungsstelle und ihrer Bedeutung im viralen Kontext näher zu untersuchen. Mit Hilfe eines neu generierten phosphospezifischen Antikörpers konnte die Lokalisation des VP30\_S29 nach rekombinanter Expression sowie während der Infektion charakterisiert werden. Dabei zeigte sich eine Co-Lokalisation des phosphorylierten VP30\_S29 mit NP in *inclusion bodies*, während nichtphosphoryliertes VP30\_S29 vornehmlich diffus im Zytoplasma verteilt war und nicht in den *inclusion bodies* ankonzentriert wurde. Diese Ergebnisse bestätigen Experimente mit den rekombinanten Proteinen VP30\_AA und VP30\_DD (138). Interessant war weiterhin, dass sich vereinzelt infizierte Zellen fanden, in denen eine Subpopulation des phosphorylierten VP30\_S29 in Aggregaten außerhalb der viralen Einschlüsse lokalisiert war. Die Funktion und Spezifität dieser Aggregate bedarf weiterer Untersuchungen.

Die diffuse Verteilung des dephosphorylierten und transkriptionsaktiven VP30 legt den Schluss nahe, dass die Primäre Transkription bei EBOV im Zytoplasma stattfindet. Erst nach einsetzender Proteinsynthese, Replikation und Bildung von Nukleokapsiden formieren sich *inclusion bodies*, die dann Zentren von viraler Transkription sowie Replikation darstellen, in denen phosphoryliertes VP30 akkumuliert.

Dies wird durch Studien mit Vesikulärem Stomatitis Virus (VSV, *Rhabdoviridae*) unterstützt. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass die initiale mRNA Synthese nach Infektion und Freisetzung der Nukleokapside außerhalb der viralen *inclusion bodies* diffus im Zytoplasma stattfindet (45). Erst nach Translation der viralen Proteine erfolgt die Rekrutierung in die viralen Einschlusskörper, wo anschließend die RNA-Synthese (Replikation und Sekundäre Transkription) stattfindet.

Man geht bisher davon aus, dass die viralen *inclusion bodies* eine Art Virusfabrik darstellen, in denen Transkription, Replikation sowie der Zusammenbau der Nukleokapside stattfinden, die von dort aus in die Zellperipherie transportiert werden. Man findet in diesen Einschlüssen eine Akkumulation viraler Nukleokapsidproteine. Für das Rabiesvirus (*Rhabdoviridae*) konnten solche viralen Einschlusskörper, Negri *bodies*, als essentielle Orte der Virusvermehrung identifiziert werden (109). Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungsstudien gelang der Nachweis von sowohl genomischer als auch antigenomischer RNA in diesen Strukturen. Ebenso konnte dort die mRNA Synthese der viralen Proteine mittels UTP Einbaus bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für die Generierung eines recEBOV mit *wildtypischen* Eigenschaften, die Präsenz eines einzigen phosphorylierbaren Serinrestes an Position 29 ausreichend war. Das Auftreten von kompensatorischen Mutationen, wenn

Serinrest 30 als einzige Phosphoakzeptorstelle vorhanden war, unterstreicht die Bedeutung der Phosphorylierung des VP30\_S29. Zudem bot die erfolgreiche Generierung eines recEBOV, welches nur eine Phosphorylierung an Position 29 erfahren kann, die Möglichkeit, die dynamische Phosphorylierung im viralen Kontext detailliert zu untersuchen. Dazu wurde ein phosphospezifischer Peptidantikörper generiert, mit dessen Hilfe nun die Lokalisation des phosphorylierten bzw. unphosphorylierten Proteins in virus-infizierten Zellen näher charakterisiert werden kann.

### 5.3 ARBEITSMODELL FÜR DIE FUNKTION DER PHOSPHORYLIERUNG DES VP30 WÄHREND TRANSKRIPTION UND REPLIKATION DES EBOV

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen die bisherige Bedeutung der Phosphorylierung des VP30 für den viralen Replikationszyklus. In dieser Arbeit wurde beschrieben, dass die Phosphorylierung des VP30 folgende virale Funktionen beeinflusst.

1) Die virale Transkription: Dephosphoryliertes VP30 unterstützt die Transkription, hingegen ist permanent phosphoryliertes VP30 dazu nicht in der Lage. Eine dynamische Phosphorylierung und Dephosphorylierung des VP30 ist essentiell für eine erfolgreiche virale Transkription unter natürlichen Bedingungen in der EBOV-infizierten Zelle.

2) Die virale Replikation: In Gegenwart eines dephosphorylierten VP30 ist die Replikation reduziert, während sie in Anwesenheit eines phosphorylierten VP30 erhöht ist.

Außerdem wurde gezeigt, dass die Interaktion von VP30 mit den Nukleokapsidproteinen NP und VP35 durch die Phosphorylierung des VP30 beeinflusst wird. Die Interaktion zwischen VP35 und VP30 wird durch die Phosphorylierung des VP30 schwächer. Im Gegenzug interagiert dephosphoryliertes VP30 stärker mit VP35 als *wildtypisches* VP30.

In Anbetracht der aktuellen Literatur zum Thema zeichnet sich folgendes Arbeitsmodell zur Kontrolle von viraler Transkription und Replikation durch die Phosphorylierung des VP30 ab (Abb. 31):

Nach Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle kommt es zur Freisetzung der Nukleokapside ins Zytoplasma [1]. VP30 liegt vermutlich in phosphorylierter und dephosphorylierter Form mit dem Nukleokapsid assoziiert vor (48). Phosphoryliertes VP30 ist dabei an NP gebunden, dephosphoryliert ist VP30 über die Interaktion mit VP35 in den Transkriptasekomplex integriert. Dephosphoryliertes VP30 wird zusammen mit der Polymerase in unmittelbare Nähe zur enkapsidierten RNA gebracht und kann so an diese binden. Die Bindung erfolgt auf Seiten des VP30 im Bereich der Phosphorylierungsstellen (95) und bezüglich der RNA wahrscheinlich

im Bereich des Transkriptionsstartsignals des ersten Gens (213). Die Initiation der Primären Transkription kann nun erfolgen [2]. Wird VP30 durch eine unbekannte zelluläre Kinase phosphoryliert [3], kommt es wahrscheinlich zur Dissoziation des VP30 vom Template durch Abstoßung zwischen negativ geladenem VP30 und der negativ geladenen RNA [4]. Gleichzeitig bindet dann das phosphorylierte VP30 verstärkt an NP des Templates, möglicherweise um die vollständige Dissoziation des VP30 aus der Nähe des Nukleokapsids zu verhindern [5]. Die Bindung des VP30 an das Nukleokapsid über das NP ist auch essentiell für die Rekrutierung in Nachkommenviren.

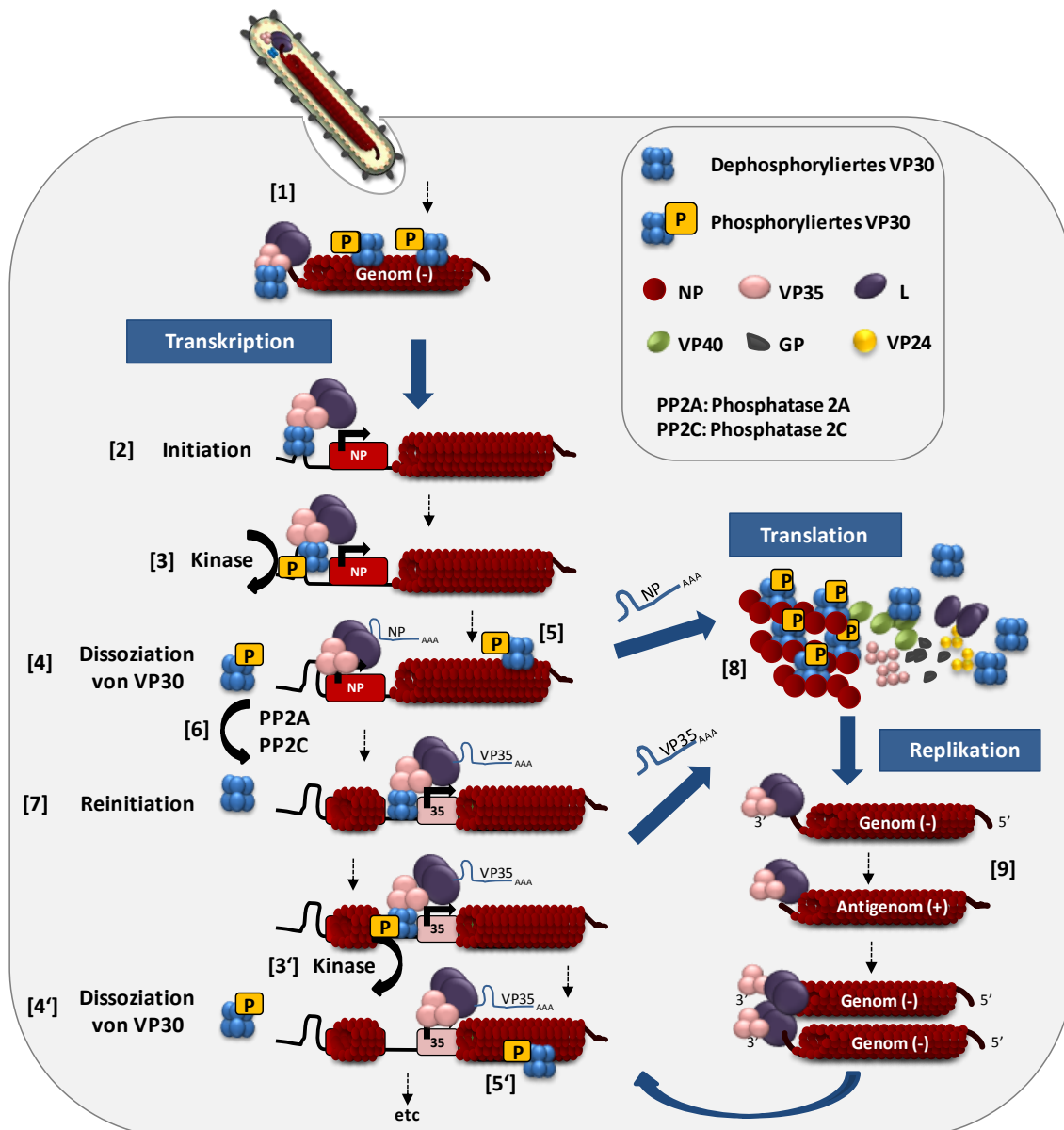


Abbildung 31: Schema des Modells für die Transkriptions- und Replikationsregulation durch die Phosphorylierung des VP30.

Wird VP30 durch die zellulären Phosphatasen PP2A oder PP2C wieder dephosphoryliert [6], bindet es erneut sowohl an den Polymerasekomplex über die Interaktion mit VP35, als auch an

die RNA und kann damit die Reinitiation der mRNA Synthese an nachfolgenden Transkriptionsstartsignalen ermöglichen [7] (128, 139) und so die Translation der viralen Proteine einleiten [8].

Die Befunde, dass phosphoryliertes VP30 die Replikation begünstigt, obwohl VP30 für die Replikation nicht erforderlich ist [9], deuten daraufhin, dass dieser Effekt indirekt erfolgt. Ein inaktiver Transkriptionskomplex könnte durch das Fehlen des VP30 oder durch Bindung eines phosphorylierten und daher inaktiven VP30 im Transkriptionskomplex diesen mechanistisch in einen Replikationskomplex überführen. Alternativ könnte der inaktive Transkriptionskomplex gegenüber dem Replikationskomplex in seiner Bindung an den genomischen Promotor benachteiligt sein und dadurch die Replikation verstärken.

Insgesamt deuten die hier gewonnenen Erkenntnisse auf einen wichtigen Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die virale Transkription und Replikation hin. Um das skizzierte Modell zu überprüfen, muss als nächstes die RNA-Bindung von VP30 hinsichtlich ihrer Phosphorylierungsabhängigkeit experimentell untersucht werden. Weiterhin soll geklärt werden, ob die phosphorylierungsabhängige Bindung von VP30 an NP oder VP35 kompetitiv erfolgt, um die postulierte Übertragung des phosphorylierten VP30 von VP35 auf NP zu untersuchen. Schließlich müssen die VP30-spezifischen Kinasen identifiziert und deren Anwesenheit im Transkriptionskomplex überprüft werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ebolavirus bildet zusammen mit dem Marburgvirus die Familie der *Filoviridae*, die ein einzelsträngiges nichtsegmentiertes RNA Genom in negativer Orientierung besitzen. Filoviren verursachen schwere hämorrhagische Fieber in Menschen und Affen, weswegen sie als BSL4-Pathogene klassifiziert werden. Die Transkriptions- und Replikationseinheit des Virus bildet der Nukleokapsidkomplex, der sich aus dem RNA-Genom sowie den Nukleokapsidproteinen NP, VP30, VP35 und L zusammensetzt. Dabei agiert VP30 als essentieller Ebolavirus-spezifischer Transkriptionsfaktor, der für die Replikation nicht benötigt wird. Die Aktivität als Transkriptionsfaktor wird über die Phosphorylierung des Proteins reguliert. Nichtphosphoryliertes VP30 unterstützt die Synthese der viralen mRNAs in einem Minigenomsystem, während das phosphorylierte VP30 die Transkription nicht aktivieren kann. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die Regulation des Übergangs von viraler Transkription zu Replikation untersucht. Dabei stand im Vordergrund der Einfluss der Phosphorylierung auf die Replikation. Mit Hilfe von phosphomimetischen Mutanten des VP30 konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes VP30 die Replikation fördert, während dephosphoryliertes VP30 einen hemmenden Effekt auf die Replikation besaß. Weiterhin wurde die Interaktion von VP30 mit den anderen Komponenten des Nukleokapsidkomplexes untersucht. Dabei wurde eine bisher unbekannte Interaktion des VP30 mit dem Polymerase Co-Faktor VP35 beschrieben, die vom Phosphorylierungsstatus des VP30 beeinflusst wurde. Möglicherweise führt die phosphorylierungsabhängige Interaktion des VP30 mit VP35 zu einem Ausschluss von VP30 aus einem putativen Transkriptasekomplex und dadurch zur Hemmung der Transkription und Stimulierung der Replikation. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine dynamische Phosphorylierung des VP30 essentiell für die initialen Schritte der Primären Transkription in frühen Stadien des viralen Lebenszyklus ist. Eine dynamische Phosphorylierung des VP30 an Serinrest 29 war ausreichend für die Generierung eines rekombinanten Ebolavirus mit *wildtypischen* Eigenschaften. Im Gegensatz dazu ließ sich ein stabiles rekombinantes Virus mit Serinrest 30 als einziger Phosphoakzeptorstelle nicht herstellen und resultierte im Auftreten von kompensatorischen Mutationen innerhalb der VP30 Phosphorylierungsdomäne.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der VP30 Phosphorylierung für den viralen Replikationszyklus: die dynamische Phosphorylierung des VP30 ist in frühen Stadien des Infektionszyklus für die Primäre Transkription essentiell und besitzt ebenfalls einen Einfluss auf den Übergang von viraler Transkription zu Replikation.

## 7 SUMMARY

Ebola virus is a negative strand RNA virus, belonging to the family *Filoviridae* together with the closely related Marburg virus. Since filoviruses cause outbreaks of a severe hemorrhagic fever with high mortality rates in humans and nonhuman primates in central Africa they are classified as BSL4 pathogens. Transcription and replication of the virus requires the viral nucleocapsid complex: the single stranded RNA genome in negative orientation which is surrounded by the nucleoprotein NP together with the viral polymerase complex consisting of L and VP35 as well as the fourth nucleocapsid protein VP30. VP30 represents an Ebola virus specific transcription factor which is essential for viral transcription but dispensable for viral replication. The activity of VP30 as transcriptional activator is regulated via its phosphorylation state: nonphosphorylated VP30 induces the initial steps of viral mRNA synthesis whereas phosphorylation of VP30 leads to a block in viral transcription.

In the first part of the thesis we investigated the role of VP30 phosphorylation for the regulation of viral transcription / replication by using VP30 mutants mimicking the different phosphorylation states of the protein. We demonstrate that viral replication was favored when VP30 was phosphorylated whereas nonphosphorylated VP30 diminished replication. By analyzing the interaction of VP30 phosphorylation mutants with the other components of the nucleocapsid complex, we identified a novel VP30-VP35 interaction which was shown to be regulated via VP30 phosphorylation. We propose a model in which the phosphorylation of VP30 might interfere with the VP35 interaction leading to the dissociation of the phosphorylated VP30 from the transcriptase complex in order to promote viral replication by VP35, L and NP. Furthermore we could demonstrate that the dynamic phosphorylation of VP30 was essential for the initiation of primary transcription at very early stages of viral infection. We describe that a possible phosphorylation of VP30 serine residue 29 was sufficient for rendering VP30 transcriptional active in order to generate a recombinant Ebola virus with only one phosphate acceptor site within VP30. The generated virus showed no significant differences regarding morphology or growth kinetics compared with a *wildtyp* virus. Moreover, the generation of a viable recombinant EBOV with VP30 serine 30 as unique phosphate acceptor was not possible and attended by the development of compensatory mutations within the VP30 phosphorylation site indicating a high evolutionary pressure on this region. These results underline the significance of the VP30 phosphorylation for the viral life cycle: while the dynamic phosphorylation is an essential requirement for the earliest steps of viral life cycle, our study suggests further a modulating role of VP30 phosphorylation for the composition of the viral polymerase complex resulting in the transition from transcription to replication processes.



## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. **C. f. D. C.** 1996. Ebola-Reston virus infection among quarantined nonhuman primates--Texas, 1996. *MMWR*. **45(15)**:314-316.
2. **(CDC), C. f. D. C. a. P.** 2009. Imported case of Marburg hemorrhagic fever - Colorado, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **58**:1377-1381.
3. **(CDC), C. f. D. C. a. P.** 2005. Outbreak of Marburg virus hemorrhagic fever--Angola, October 1, 2004-March 29, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **54**:308-309.
4. **Aleksandrowicz, P., A. Marzi, N. Biedenkopf, N. Beimforde, S. Becker, T. Hoenen, H. Feldmann, and H. J. Schnittler.** 2011. Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. *J Infect Dis* **204 Suppl 3**:S957-967.
5. **Alvarez, C. P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A. L. Corbi, and R. Delgado.** 2002. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol.* **76**:6841-6844.
6. **Ascenzi, P., A. Bocedi, J. Heptonstall, M. R. Capobianchi, A. Di Caro, E. Mastrangelo, M. Bolognesi, and G. Ippolito.** 2008. Ebolavirus and Marburgvirus: insight the Filoviridae family. *Mol Aspects Med* **29**:151-185.
7. **Asenjo, A., E. Calvo, and N. Villanueva.** 2006. Phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein at threonine 108 controls its interaction with the M2-1 protein in the viral RNA polymerase complex. *J Gen Virol.* **87**:3637-3642.
8. **Baize, S., E. M. Leroy, A. J. Georges, M. C. Georges-Courbot, M. Capron, I. Bedjabaga, J. Lansoud-Soukate, and E. Mavoungou.** 2002. Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. *Clin Exp Immunol* **128**:163-168.
9. **Baize, S., E. M. Leroy, M. C. Georges-Courbot, M. Capron, J. Lansoud-Soukate, P. Debre, S. P. Fisher-Hoch, J. B. McCormick, and A. J. Georges.** 1999. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med.* **5**:423-426.
10. **Baize, S., P. Marianneau, M. C. Georges-Courbot, and V. Deubel.** 2001. Recent advances in vaccines against viral haemorrhagic fevers. *Curr Opin Infect Dis.* **14**:513-518.
11. **Banerjee, A. K.** 2008. Response to "Non-segmented negative-strand RNA virus RNA synthesis in vivo". *Virology* **371**:231-233.
12. **Bar, S., A. Takada, Y. Kawaoka, and M. Alizon.** 2006. Detection of cell-cell fusion mediated by Ebola virus glycoproteins. *J Virol.* **80**:2815-2822.
13. **Barik, S., and A. K. Banerjee.** 1992. Phosphorylation by cellular casein kinase II is essential for transcriptional activity of vesicular stomatitis virus phosphoprotein P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6570-6574.
14. **Barik, S., and A. K. Banerjee.** 1992. Sequential phosphorylation of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus by cellular and viral protein kinases is essential for transcription activation. *J Virol* **66**:1109-1118.
15. **Baron, R. C., J. B. McCormick, and O. A. Zubeir.** 1983. Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull World Health Organ.* **61**:997-1003.
16. **Barrette, R. W., S. A. Metwally, J. M. Rowland, L. Xu, S. R. Zaki, S. T. Nichol, P. E. Rollin, J. S. Towner, W. J. Shieh, B. Batten, T. K. Sealy, C. Carrillo, K. E. Moran, A. J. Bracht, G. A. Mayr, M. Sirios-Cruz, D. P. Catbagan, E. A. Lautner, T. G. Ksiazek, W. R. White, and M. T. McIntosh.** 2009. Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. *Science* **325**:204-206.
17. **Basler, C. F., A. Mikulasova, L. Martinez-Sobrido, J. Paragas, E. Muhlberger, M. Bray, H. D. Klenk, P. Palese, and A. Garcia-Sastre.** 2003. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol.* **77**:7945-7956.
18. **Basler, C. F., X. Wang, E. Muhlberger, V. Volchkov, J. Paragas, H. D. Klenk, A. Garcia-Sastre, and P. Palese.** 2000. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:12289-12294.
19. **Bausch, D. G., M. Borchert, T. Grein, C. Roth, R. Swanepoel, M. L. Libande, A. Talarmin, E. Bertherat, J. J. Muyembe-Tamfum, B. Tugume, R. Colebunders, K. M. Kondé, P. Pirad, L. L. Olinda, G. R. Rodier, P. Campbell, O. Tomori, T. G. Ksiazek, and P. E. Rollin.** 2003. Risk factors for Marburg hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo. *Emerg Infect Dis* **9**:1531-1537.

20. **Bavari, S., C. M. Bosio, E. Wiegand, G. Ruthel, A. B. Will, T. W. Geisbert, M. Hevey, C. Schmaljohn, A. Schmaljohn, and M. J. Aman.** 2002. Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med.* **195**:593-602.
21. **Bermejo, M., J. D. Rodríguez-Teijeiro, G. Illera, A. Barroso, C. Vilà, and P. D. Walsh.** 2006. Ebola outbreak killed 5000 gorillas. *Science* **314**:1564.
22. **Bhattacharyya, S., K. L. Warfield, G. Ruthel, S. Bavari, M. J. Aman, and T. J. Hope.** 2010. Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway. *Virology* **401**:18-28.
23. **Biedenkopf, N.** 2006. Die Rolle der Phosphorylierung des Ebolavirus VP30 für die virale initiale Transkription und die Lokalisation der VP30-Interaktionsdomäne auf dem Nukleoprotein. Philipps-Universität Marburg.
24. **Biek, R., P. D. Walsh, E. M. Leroy, and L. A. Real.** 2006. Recent common ancestry of Ebola Zaire virus found in a bat reservoir. *PLoS Pathog* **2**:e90.
25. **Bosio, C. M., M. J. Aman, C. Grogan, R. Hogan, G. Ruthel, D. Negley, M. Mohamadzadeh, S. Bavari, and A. Schmaljohn.** 2003. Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation. *J Infect Dis.* **188**:1630-1638.
26. **Bosio, C. M., B. D. Moore, K. L. Warfield, G. Ruthel, M. Mohamadzadeh, M. J. Aman, and S. Bavari.** 2004. Ebola and Marburg virus-like particles activate human myeloid dendritic cells. *Virology.* **326**:280-287.
27. **Bowen, E. T., G. Lloyd, W. J. Harris, G. S. Platt, A. Baskerville, and E. E. Vella.** 1977. Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent. *Lancet.* **1**:571-573.
28. **Bradfute, S. B., D. R. Braun, J. D. Shamblin, J. B. Geisbert, J. Paragas, A. Garrison, L. E. Hensley, and T. W. Geisbert.** 2007. Lymphocyte death in a mouse model of Ebola virus infection. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**:S296-304.
29. **Brauburger, K.** 2009. Die Rolle der Gengrenzen in der Transkriptionsregulation von Zaire Ebolavirus, <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2009/0464/>.
30. **Brindley, M. A., C. L. Hunt, A. S. Kondratowicz, J. Bowman, P. L. Sinn, P. B. McCray, K. Quinn, M. L. Weller, J. A. Chiorini, and W. Maury.** 2011. Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein. *Virology* **415**:83-94.
31. **Brown, R. S.** 2005. Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol* **15**:94-98.
32. **Bukreyev, A., P. E. Rollin, M. K. Tate, L. Yang, S. R. Zaki, W. J. Shieh, B. R. Murphy, P. L. Collins, and A. Sanchez.** 2007. Successful Topical Respiratory Tract Immunization Of Primates Against Ebola Virus. *J Virol.*
33. **Bwaka, M. A., M. J. Bonnet, P. Calain, R. Colebunders, A. De Roo, Y. Guimard, K. R. Katwiri, K. Kibadi, M. A. Kipasa, K. J. Kuvula, B. B. Mapanda, M. Massamba, K. D. Mupapa, J. J. Muyembe-Tamfum, E. Ndaberey, C. J. Peters, P. E. Rollin, and E. Van den Enden.** 1999. Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J Infect Dis.* **179 Suppl 1**:S1-7.
34. **Caillaud, D., F. Levréro, R. Cristescu, S. Gatti, M. Dewas, M. Douadi, A. Gautier-Hion, M. Raymond, and N. Ménard.** 2006. Gorilla susceptibility to Ebola virus: the cost of sociality. *Curr Biol* **16**:R489-491.
35. **Calain, P., M. C. Monroe, and S. T. Nichol.** 1999. Ebola virus defective interfering particles and persistent infection. *Virology* **262**:114-128.
36. **Calain, P., and L. Roux.** 1995. Functional characterisation of the genomic and antigenomic promoters of Sendai virus. *Virology* **212**:163-173.
37. **Carette, J. E., M. Raaben, A. C. Wong, A. S. Herbert, G. Obernosterer, N. Mulherkar, A. I. Kuehne, P. J. Kranzusch, A. M. Griffin, G. Ruthel, P. Dal Cin, J. M. Dye, S. P. Whelan, K. Chandran, and T. R. Brummelkamp.** 2011. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* **477**:340-343.
38. **Cartee, T. L., and G. W. Wertz.** 2001. Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection. *J Virol.* **75**:12188-12197.
39. **Chan, S. Y., C. J. Empig, F. J. Welte, R. F. Speck, A. Schmaljohn, J. F. Kreisberg, and M. A. Goldsmith.** 2001. Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell.* **106**:117-126.
40. **Chandran, K., N. J. Sullivan, U. Felbor, S. P. Whelan, and J. M. Cunningham.** 2005. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science.* **308**:1643-1645.

41. **Colebunders, R., A. Tshomba, M. D. Van Kerkhove, D. G. Bausch, P. Campbell, M. Libande, P. Pirard, F. Tshioko, S. Mardel, S. Mulangu, H. Sleurs, P. E. Rollin, J. J. Muyembe-Tamfum, B. Jeffs, M. Borchert, and I. S. a. T. C. D. W. D. M. O. I. Group".** 2007. Marburg hemorrhagic fever in Durba and Watsa, Democratic Republic of the Congo: clinical documentation, features of illness, and treatment. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**:S148-153.
42. **Collins, P. L., M. G. Hill, E. Camargo, H. Grosfeld, R. M. Chanock, and B. R. Murphy.** 1995. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:11563-11567.
43. **Curran, J., and D. Kolakofsky.** 2008. Nonsegmented negative-strand RNA virus RNA synthesis in vivo. *Virology* **371**:227-230.
44. **Côté, M., J. Misasi, T. Ren, A. Bruchez, K. Lee, C. M. Filone, L. Hensley, Q. Li, D. Ory, K. Chandran, and J. Cunningham.** 2011. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* **477**:344-348.
45. **Das, S. C., D. Nayak, Y. Zhou, and A. K. Pattnaik.** 2006. Visualization of intracellular transport of vesicular stomatitis virus nucleocapsids in living cells. *J Virol* **80**:6368-6377.
46. **Das, S. C., and A. K. Pattnaik.** 2004. Phosphorylation of vesicular stomatitis virus phosphoprotein P is indispensable for virus growth. *J Virol* **78**:6420-6430.
47. **Dixon, M. P., R. N. Pau, G. J. Howlett, D. E. Dunstan, W. H. Sawyer, and B. E. Davidson.** 2002. The central domain of Escherichia coli TyrR is responsible for hexamerization associated with tyrosine-mediated repression of gene expression. *J Biol Chem* **277**:23186-23192.
48. **Elliott, L. H., M. P. Kiley, and J. B. McCormick.** 1985. Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology.* **147**:169-176.
49. **Empig, C. J., and M. A. Goldsmith.** 2002. Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *J Virol.* **76**:5266-5270.
50. **Enterlein, S., K. M. Schmidt, M. Schümann, D. Conrad, V. Krähling, J. Olejnik, and E. Mühlberger.** 2009. The marburg virus 3' noncoding region structurally and functionally differs from that of ebola virus. *J Virol* **83**:4508-4519.
51. **Fearns, R., and P. L. Collins.** 1999. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* **73**:5852-5864.
52. **Feldmann, H., H. Bugany, F. Mahner, H. D. Klenk, D. Drenckhahn, and H. J. Schnittler.** 1996. Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol.* **70**:2208-2214.
53. **Feldmann, H., S. M. Jones, K. M. Daddario-DiCaprio, J. B. Geisbert, U. Ströher, A. Grolla, M. Bray, E. A. Fritz, L. Fernando, F. Feldmann, L. E. Hensley, and T. W. Geisbert.** 2007. Effective post-exposure treatment of Ebola infection. *PLoS Pathog* **3**:e2.
54. **Feldmann, H., and M. P. Kiley.** 1999. Classification, structure, and replication of filoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**:1-21.
55. **Feldmann, H., V. Wahl-Jensen, S. M. Jones, and U. Ströher.** 2004. Ebola virus ecology: a continuing mystery. *Trends Microbiol* **12**:433-437.
56. **Feldmann, H., C. Will, M. Schikore, W. Slenczka, and H. D. Klenk.** 1991. Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus. *Virology.* **182**:353-356.
57. **Fisher-Hoch, S. P., G. S. Platt, G. H. Neild, T. Southee, A. Baskerville, R. T. Raymond, G. Lloyd, and D. I. Simpson.** 1985. Pathophysiology of shock and hemorrhage in a fulminating viral infection (Ebola). *J Infect Dis* **152**:887-894.
58. **Formenty, P., C. Boesch, M. Wyers, C. Steiner, F. Donati, F. Dind, F. Walker, and B. Le Guenno.** 1999. Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Côte d'Ivoire. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S120-126.
59. **Formenty, P., C. Hatz, B. Le Guenno, A. Stoll, P. Rogenmoser, and A. Widmer.** 1999. Human infection due to Ebola virus, subtype Côte d'Ivoire: clinical and biologic presentation. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S48-53.
60. **Fuentes, S. M., D. Sun, A. P. Schmitt, and B. He.** 2010. Phosphorylation of paramyxovirus phosphoprotein and its role in viral gene expression. *Future Microbiol* **5**:9-13.
61. **Funke, C., S. Becker, H. Dartsch, H. D. Klenk, and E. Mühlberger.** 1995. Acylation of the Marburg virus glycoprotein. *Virology.* **208**:289-297.
62. **Geisbert, T. W., M. Bailey, L. Hensley, C. Asiedu, J. Geisbert, D. Stanley, A. Honko, J. Johnson, S. Mulangu, M. G. Pau, J. Custers, J. Vellinga, J. Hendriks, P. Jahrling, M. Roederer, J.**

- Goudsmit, R. Koup, and N. J. Sullivan.** 2011. Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge. *J Virol* **85**:4222-4233.
63. **Geisbert, T. W., K. M. Daddario-Dicaprio, J. B. Geisbert, D. S. Reed, F. Feldmann, A. Grolla, U. Ströher, E. A. Fritz, L. E. Hensley, S. M. Jones, and H. Feldmann.** 2008. Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect nonhuman primates against aerosol challenge with Ebola and Marburg viruses. *Vaccine* **26**:6894-6900.
64. **Geisbert, T. W., K. M. Daddario-Dicaprio, M. G. Lewis, J. B. Geisbert, A. Grolla, A. Leung, J. Paragas, L. Matthias, M. A. Smith, S. M. Jones, L. E. Hensley, H. Feldmann, and P. B. Jahrling.** 2008. Vesicular stomatitis virus-based ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates. *PLoS Pathog* **4**:e1000225.
65. **Geisbert, T. W., K. M. Daddario-DiCaprio, K. J. Williams, J. B. Geisbert, A. Leung, F. Feldmann, L. E. Hensley, H. Feldmann, and S. M. Jones.** 2008. Recombinant vesicular stomatitis virus vector mediates postexposure protection against Sudan Ebola hemorrhagic fever in nonhuman primates. *J Virol* **82**:5664-5668.
66. **Geisbert, T. W., and L. E. Hensley.** 2004. Ebola virus: new insights into disease aetiopathology and possible therapeutic interventions. *Expert Rev Mol Med.* **6**:1-24.
67. **Geisbert, T. W., L. E. Hensley, T. R. Gibb, K. E. Steele, N. K. Jaax, and P. B. Jahrling.** 2000. Apoptosis induced in vitro and in vivo during infection by Ebola and Marburg viruses. *Lab Invest* **80**:171-186.
68. **Geisbert, T. W., L. E. Hensley, P. B. Jahrling, T. Larsen, J. B. Geisbert, J. Paragas, H. A. Young, T. M. Fredeking, W. E. Rote, and G. P. Vlasuk.** 2003. Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys. *Lancet.* **362**:1953-1958.
69. **Geisbert, T. W., and P. B. Jahrling.** 1995. Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res.* **39**:129-150.
70. **Geisbert, T. W., P. B. Jahrling, M. A. Hanes, and P. M. Zack.** 1992. Association of Ebola-related Reston virus particles and antigen with tissue lesions of monkeys imported to the United States. *J Comp Pathol* **106**:137-152.
71. **Gramberg, T., H. Hofmann, P. Moller, P. F. Lalor, A. Marzi, M. Geier, M. Krumbiegel, T. Winkler, F. Kirchhoff, D. H. Adams, S. Becker, J. Munch, and S. Pohlmann.** 2005. LSEctin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology.* **340**:224-236.
72. **Groseth, A., J. E. Charton, M. Sauerborn, F. Feldmann, S. M. Jones, T. Hoenen, and H. Feldmann.** 2009. The Ebola virus ribonucleoprotein complex: a novel VP30-L interaction identified. *Virus Res* **140**:8-14.
73. **Groseth, A., H. Feldmann, and J. E. Strong.** 2007. The ecology of Ebola virus. *Trends Microbiol* **15**:408-416.
74. **Grosfeld, H., M. G. Hill, and P. L. Collins.** 1995. RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *J Virol* **69**:5677-5686.
75. **Han, Z., H. Boshra, J. O. Sunyer, S. H. Zwiars, J. Paragas, and R. N. Harty.** 2003. Biochemical and functional characterization of the Ebola virus VP24 protein: implications for a role in virus assembly and budding. *J Virol.* **77**:1793-1800.
76. **Hartlieb, B.** 2006. Untersuchungen zur Funktion des Ebola-Virus-VP30 im Nukleokapsidkomplex basierend auf der Röntgenstrukturanalyse des VP30 C-Terminus. Philipps-Universität Marburg, Marburg.
77. **Hartlieb, B., J. Modrof, E. Muhlberger, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2003. Oligomerization of Ebola virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide. *J Biol Chem.* **278**:41830-41836.
78. **Hartlieb, B., T. Muziol, W. Weissenhorn, and S. Becker.** 2007. Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**:624-629.
79. **Hartlieb, B., and W. Weissenhorn.** 2006. Filovirus assembly and budding. *Virology.* **344**:64-70.
80. **Harty, R. N., M. E. Brown, G. Wang, J. Huibregtse, and F. P. Hayes.** 2000. A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:13871-13876.

81. **Hensley, L. E., S. M. Jones, H. Feldmann, P. B. Jahrling, and T. W. Geisbert.** 2005. Ebola and Marburg viruses: pathogenesis and development of countermeasures. *Curr Mol Med* **5**:761-772.
82. **Hoenen, T., A. Groseth, F. de Kok-Mercado, J. H. Kuhn, and V. Wahl-Jensen.** 2011. Minigenomes, transcription and replication competent virus-like particles and beyond: Reverse genetics systems for filoviruses and other negative stranded hemorrhagic fever viruses. *Antiviral Res.*
83. **Hoenen, T., A. Groseth, D. Falzarano, and H. Feldmann.** 2006. Ebola virus: unravelling pathogenesis to combat a deadly disease. *Trends Mol Med* **12**:206-215.
84. **Hoenen, T., A. Groseth, L. Kolesnikova, S. Theriault, H. Ebihara, B. Hartlieb, S. Bamberg, H. Feldmann, U. Stroher, and S. Becker.** 2006. Infection of naive target cells with virus-like particles: implications for the function of ebola virus VP24. *J Virol.* **80**:7260-7264.
85. **Hoenen, T., S. Jung, A. Herwig, A. Groseth, and S. Becker.** 2010. Both matrix proteins of Ebola virus contribute to the regulation of viral genome replication and transcription. *Virology* **403**:56-66.
86. **Hunt, C. L., A. A. Kolokoltsov, R. A. Davey, and W. Maury.** 2011. The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebolavirus. *J Virol* **85**:334-347.
87. **Hwang, L. N., N. Englund, T. Das, A. K. Banerjee, and A. K. Pattnaik.** 1999. Optimal replication activity of vesicular stomatitis virus RNA polymerase requires phosphorylation of a residue(s) at carboxy-terminal domain II of its accessory subunit, phosphoprotein P. *J Virol* **73**:5613-5620.
88. **Ikegami, T., M. E. Miranda, A. B. Calaor, D. L. Manalo, N. J. Miranda, M. Niikura, M. Saijo, Y. Une, Y. Nomura, I. Kurane, T. G. Ksiazek, Y. Yoshikawa, and S. Morikawa.** 2002. Histopathology of natural Ebola virus subtype Reston infection in cynomolgus macaques during the Philippine outbreak in 1996. *Exp Anim* **51**:447-455.
89. **Ito, H., S. Watanabe, A. Sanchez, M. A. Whitt, and Y. Kawaoka.** 1999. Mutational analysis of the putative fusion domain of Ebola virus glycoprotein. *J Virol.* **73**:8907-8912.
90. **Ito, H., S. Watanabe, A. Takada, and Y. Kawaoka.** 2001. Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *Journal of Virology.* **75**:1576-1580.
91. **Jahrling, P. B., T. W. Geisbert, D. W. Dalgard, E. D. Johnson, T. G. Ksiazek, W. C. Hall, and C. J. Peters.** 1990. Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet.* **335**:502-505.
92. **Jahrling, P. B., T. W. Geisbert, J. B. Geisbert, J. R. Swearengen, M. Bray, N. K. Jaax, J. W. Huggins, J. W. LeDuc, and C. J. Peters.** 1999. Evaluation of immune globulin and recombinant interferon-alpha2b for treatment of experimental Ebola virus infections. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S224-234.
93. **Jahrling, P. B., T. W. Geisbert, N. K. Jaax, M. A. Hanes, T. G. Ksiazek, and C. J. Peters.** 1996. Experimental infection of cynomolgus macaques with Ebola-Reston filoviruses from the 1989-1990 U.S. epizootic. *Arch Virol Suppl* **11**:115-134.
94. **Jasenosky, L. D., G. Neumann, I. Lukashevich, and Y. Kawaoka.** 2001. Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. *J Virol.* **75**:5205-5214.
95. **John, S. P., T. Wang, S. Steffan, S. Longhi, C. S. Schmaljohn, and C. B. Jonsson.** 2007. The Ebola Virus VP30 is an RNA Binding Protein. *J Virol.*
96. **Johnson, K. M., J. V. Lange, P. A. Webb, and F. A. Murphy.** 1977. Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet.* **1**:569-571.
97. **Jones, S. M., H. Feldmann, U. Stroher, J. B. Geisbert, L. Fernando, A. Grolla, H. D. Klenk, N. J. Sullivan, V. E. Volchkov, E. A. Fritz, K. M. Daddario, L. E. Hensley, P. B. Jahrling, and T. W. Geisbert.** 2005. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med.* **11**:786-790.
98. **Karber, G.** 1931. 50% end-point calculation. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **162**, 480-483. **162**:480-483.
99. **Karesh, W., and P. Reed.** 2005. Ebola and great apes in Central Africa: current status and future needs. *Bull Soc Pathol Exot* **98**:237-238.
100. **Kiley, M. P., E. T. Bowen, G. A. Eddy, M. Isaacson, K. M. Johnson, J. B. McCormick, F. A. Murphy, S. R. Pattyn, D. Peters, O. W. Prozesky, R. L. Regnery, D. I. Simpson, W. Slenczka, P. Sureau, G. van der Groen, P. A. Webb, and H. Wulff.** 1982. Filoviridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses?. *Intervirology.* **18**:24-32.

101. **Kobinger, G. P., A. Leung, J. Neufeld, J. S. Richardson, D. Falzarano, G. Smith, K. Tierney, A. Patel, and H. M. Weingartl.** 2011. Replication, Pathogenicity, Shedding, and Transmission of Zaire ebolavirus in Pigs. *J Infect Dis* **204**:200-208.
102. **Kolakofsky, D., P. Le Mercier, F. Iseni, and D. Garcin.** 2004. Viral DNA polymerase scanning and the gymnastics of Sendai virus RNA synthesis. *Virology*. **318**:463-473.
103. **Kolesnikova, L., S. Bamberg, B. Berghofer, and S. Becker.** 2004. The matrix protein of Marburg virus is transported to the plasma membrane along cellular membranes: exploiting the retrograde late endosomal pathway. *J Virol*. **78**:2382-2393.
104. **Kolesnikova, L., B. Berghofer, S. Bamberg, and S. Becker.** 2004. Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope. *Journal of Virology*. **78**:12277-12287.
105. **Kolesnikova, L., A. B. Bohil, R. E. Cheney, and S. Becker.** 2007. Budding of Marburgvirus is associated with filopodia. *Cell Microbiol* **9**:939-951.
106. **Kolesnikova, L. a. B. S.** 2004. Virus maturation. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.
107. **Kondratowicz, A. S., N. J. Lennemann, P. L. Sinn, R. A. Davey, C. L. Hunt, S. Moller-Tank, D. K. Meyerholz, P. Rennert, R. F. Mullins, M. Brindley, L. M. Sandersfeld, K. Quinn, M. Weller, P. B. McCray, J. Chiorini, and W. Maury.** 2011. From the Cover: T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:8426-8431.
108. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
109. **Lahaye, X., A. Vidy, C. Pomier, L. Obiang, F. Harper, Y. Gaudin, and D. Blondel.** 2009. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol* **83**:7948-7958.
110. **Le Guenno, B., P. Formenty, and C. Boesch.** 1999. Ebola virus outbreaks in the Ivory Coast and Liberia, 1994-1995. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**:77-84.
111. **Lenard, J.** 1999. Host cell protein kinases in nonsegmented negative-strand virus (mononegavirales) infection. *Pharmacol Ther* **83**:39-48.
112. **Leroy, E., X. Pourrut, and J. P. Gonzalez.** 2006. [Bats, reserves of the Ebola virus: the mystery is dissipated]. *Med Sci (Paris)* **22**:78-79.
113. **Leroy, E. M., S. Baize, P. Debre, J. Lansoud-Soukate, and E. Mavoungou.** 2001. Early immune responses accompanying human asymptomatic Ebola infections. *Clin Exp Immunol*. **124**:453-460.
114. **Leroy, E. M., S. Baize, V. E. Volchkov, S. P. Fisher-Hoch, M. C. Georges-Courbot, J. Lansoud-Soukate, M. Capron, P. Debré, J. B. McCormick, and A. J. Georges.** 2000. Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *Lancet* **355**:2210-2215.
115. **Leroy, E. M., A. Epelboin, V. Mondonge, X. Pourrut, J. P. Gonzalez, J. J. Muyembe-Tamfum, and P. Formenty.** 2009. Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* **9**:723-728.
116. **Leroy, E. M., J. P. Gonzalez, and S. Baize.** 2011. Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. *Clin Microbiol Infect* **17**:964-976.
117. **Leroy, E. M., B. Kumulungui, X. Pourrut, P. Rouquet, A. Hassanin, P. Yaba, A. Délicat, J. T. Paweska, J. P. Gonzalez, and R. Swanepoel.** 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* **438**:575-576.
118. **Leroy, E. M., P. Telfer, B. Kumulungui, P. Yaba, P. Rouquet, P. Roques, J. P. Gonzalez, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, and E. Nerrienet.** 2004. A serological survey of Ebola virus infection in central African nonhuman primates. *J Infect Dis* **190**:1895-1899.
119. **Licata, J. M., R. F. Johnson, Z. Han, and R. N. Harty.** 2004. Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *J Virol*. **78**:7344-7351.
120. **Licata, J. M., M. Simpson-Holley, N. T. Wright, Z. Han, J. Paragas, and R. N. Harty.** 2003. Overlapping motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola virus VP40 protein function independently as late budding domains: involvement of host proteins TSG101 and VPS-4. *J Virol*. **77**:1812-1819.
121. **MacNeil, A., E. C. Farnon, J. Wamala, S. Okware, D. L. Cannon, Z. Reed, J. S. Towner, J. W. Tappero, J. Lutwama, R. Downing, S. T. Nichol, T. G. Ksiazek, and P. E. Rollin.** 2010. Proportion of deaths and clinical features in Bundibugyo Ebola virus infection, Uganda. *Emerg Infect Dis* **16**:1969-1972.

122. **Mahanty, S., and M. Bray.** 2004. Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *Lancet Infect Dis.* **4**:487-498.
123. **Manicassamy, B., J. Wang, H. Jiang, and L. Rong.** 2005. Comprehensive analysis of ebola virus GP1 in viral entry. *J Virol.* **79**:4793-4805.
124. **Manicassamy, B., J. Wang, E. Rumschlag, S. Tymen, V. Volchkova, V. Volchkov, and L. Rong.** 2007. Characterization of Marburg virus glycoprotein in viral entry. *Virology* **358**:79-88.
125. **Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz.** 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med.* **7**:1313-1319.
126. **Martinez, M. J., V. A. Volchkova, H. Raoul, N. Alazard-Dany, O. Reynard, and V. E. Volchkov.** 2011. Role of VP30 Phosphorylation in the Ebola Virus Replication Cycle. *J Infect Dis* **204 Suppl 3**:S934-940.
127. **Martini, G. A.** 1971. Marburg Virus Disease, Clinical Syndrome. In: *Marburg Virus Disease.* (Martini, G. A. and Siegert, R., eds.). 1st ed. Springer Verlag, New York, USA:1-230.
128. **Martínez, M. J., N. Biedenkopf, V. Volchkova, B. Hartlieb, N. Alazard-Dany, O. Reynard, S. Becker, and V. Volchkov.** 2008. Role of Ebola virus VP30 in transcription reinitiation. *J Virol* **82**:12569-12573.
129. **Marzi, A., A. Akhavan, G. Simmons, T. Gramberg, H. Hofmann, P. Bates, V. R. Lingappa, and S. Pohlmann.** 2006. The signal peptide of the ebolavirus glycoprotein influences interaction with the cellular lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol.* **80**:6305-6317.
130. **Marzi, A., T. Gramberg, G. Simmons, P. Moller, A. J. Rennekamp, M. Krumbiegel, M. Geier, J. Eisemann, N. Turza, B. Saunier, A. Steinkasserer, S. Becker, P. Bates, H. Hofmann, and S. Pohlmann.** 2004. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol.* **78**:12090-12095.
131. **Mason, S. W., E. Aberg, C. Lawetz, R. DeLong, P. Whitehead, and M. Liuzzi.** 2003. Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and P proteins is required for reconstitution of M2-1-dependent RSV minigenome activity. *J Virol.* **77**:10670-10676.
132. **Mateo, M., S. P. Reid, L. W. Leung, C. F. Basler, and V. E. Volchkov.** 2010. Ebolavirus VP24 binding to karyopherins is required for inhibition of interferon signaling. *J Virol* **84**:1169-1175.
133. **Mavrakís, M., L. Kolesnikova, G. Schoehn, S. Becker, and R. W. Ruigrok.** 2002. Morphology of Marburg virus NP-RNA. *Virology.* **296**:300-307.
134. **Mehedi, M., D. Falzarano, J. Seebach, X. Hu, M. S. Carpenter, H. J. Schnittler, and H. Feldmann.** 2011. A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. *J Virol* **85**:5406-5414.
135. **Miranda, M. E., Y. Yoshikawa, D. L. Manalo, A. B. Calaor, N. L. Miranda, F. Cho, T. Ikegami, and T. G. Ksiazek.** 2002. Chronological and spatial analysis of the 1996 Ebola Reston virus outbreak in a monkey breeding facility in the Philippines. *Exp Anim* **51**:173-179.
136. **Mittler, E., L. Kolesnikova, T. Strecker, W. Garten, and S. Becker.** 2007. Role of the transmembrane domain of marburg virus surface protein GP in assembly of the viral envelope. *J Virol* **81**:3942-3948.
137. **Modrof, J.** 2002. Strukturelle Charakteristika des Ebola-Virus VP30 und deren funktionelle Bedeutung. Philipps-Universität Marburg, Marburg.
138. **Modrof, J., S. Becker, and E. Mühlberger.** 2003. Ebola virus transcription activator VP30 is a zinc-binding protein. *J Virol.* **77**:3334-3338.
139. **Modrof, J., E. Muhlberger, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2002. Phosphorylation of VP30 impairs ebola virus transcription. *J Biol Chem.* **277**:33099-33104.
140. **Mupapa, K., M. Massamba, K. Kibadi, K. Kuvula, A. Bwaka, M. Kipasa, R. Colebunders, and J. J. Muyembe-Tamfum.** 1999. Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusions from convalescent patients. International Scientific and Technical Committee. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S18-23.
141. **Mühlberger, E.** 2004. Genome organization, replication and transcription of filoviruses. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.
142. **Mühlberger, E., B. Lotfering, H.-D. Klenk, and S. Becker.** 1998. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J Virol.* **72**:8756-8764.
143. **Mühlberger, E., S. Trommer, C. Funke, V. Volchkov, H. D. Klenk, and S. Becker.** 1996. Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. *Virology.* **223**:376-380.

144. **Mühlberger, E., M. Weik, V. E. Volchkov, H.-D. Klenk, and S. Becker.** 1999. Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J Virol.* **73**:2333-2342.
145. **Nanbo, A., M. Imai, S. Watanabe, T. Noda, K. Takahashi, G. Neumann, P. Halfmann, and Y. Kawaoka.** 2010. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog* **6**.
146. **Neumann, G., H. Feldmann, S. Watanabe, I. Lukashevich, and Y. Kawaoka.** 2002. Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol* **76**:406-410.
147. **Nkoghe, D., P. Formenty, E. M. Leroy, S. Nnegue, S. Y. Edou, J. I. Ba, Y. Allaranger, J. Cabore, C. Bachy, R. Andraghetti, A. C. de Benoist, E. Galanis, A. Rose, D. Bausch, M. Reynolds, P. Rollin, C. Choueibou, R. Shongo, B. Gergonne, L. M. Koné, A. Yada, C. Roth, and M. T. Mve.** 2005. [Multiple Ebola virus haemorrhagic fever outbreaks in Gabon, from October 2001 to April 2002]. *Bull Soc Pathol Exot* **98**:224-229.
148. **Nkoghe, D., S. Nnegue, M. T. Mve, P. Formenty, G. Thompson, J. Iba Ba, M. Okome Nkoumou, and E. Leroy.** 2005. [Isolated case of haemorrhagic fever observed in Gabon during the 2002 outbreak of Ebola but distant from epidemic zones]. *Med Trop (Mars)* **65**:349-354.
149. **Noda, T., K. Aoyama, H. Sagara, H. Kida, and Y. Kawaoka.** 2005. Nucleocapsid-like structures of Ebola virus reconstructed using electron tomography. *J Vet Med Sci* **67**:325-328.
150. **Noda, T., K. Hagiwara, H. Sagara, and Y. Kawaoka.** 2010. Characterization of the Ebola virus nucleoprotein-RNA complex. *J Gen Virol* **91**:1478-1483.
151. **Noda, T., H. Sagara, E. Suzuki, A. Takada, H. Kida, and Y. Kawaoka.** 2002. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol.* **76**:4855-4865.
152. **Noda, T., S. Watanabe, H. Sagara, and Y. Kawaoka.** 2007. Mapping of the VP40-binding regions of the nucleoprotein of Ebola virus. *J Virol* **81**:3554-3562.
153. **Normile, D.** 2009. Emerging infectious diseases. Scientists puzzle over Ebola-Reston virus in pigs. *Science* **323**:451.
154. **Peters, C. J., and J. W. LeDuc.** 1999. An introduction to Ebola: the virus and the disease. *J Infect Dis.* **179 Suppl 1**:ix-xvi.
155. **Peterson, A. T., J. T. Bauer, and J. N. Mills.** 2004. Ecologic and geographic distribution of filovirus disease. *Emerg Infect Dis* **10**:40-47.
156. **Plattet, P., L. Strahle, P. le Mercier, S. Hausmann, D. Garcin, and D. Kolakofsky.** 2007. Sendai virus RNA polymerase scanning for mRNA start sites at gene junctions. *Virology* **362**:411-420.
157. **Pourrut, X., M. Souris, J. S. Towner, P. E. Rollin, S. T. Nichol, J. P. Gonzalez, and E. Leroy.** 2009. Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus*. *BMC Infect Dis* **9**:159.
158. **Pratt, W. D., D. Wang, D. K. Nichols, M. Luo, J. Woraratanadharm, J. M. Dye, D. H. Holman, and J. Y. Dong.** 2010. Protection of nonhuman primates against two species of Ebola virus infection with a single complex adenovirus vector. *Clin Vaccine Immunol* **17**:572-581.
159. **Prins, K. C., J. M. Binning, R. S. Shabman, D. W. Leung, G. K. Amarasinghe, and C. F. Basler.** 2010. Basic residues within the ebolavirus VP35 protein are required for its viral polymerase cofactor function. *J Virol* **84**:10581-10591.
160. **Qanungo, K. R., D. Shaji, M. Mathur, and A. K. Banerjee.** 2004. Two RNA polymerase complexes from vesicular stomatitis virus-infected cells that carry out transcription and replication of genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:5952-5957.
161. **Regnery, R. L., K. M. Johnson, and M. P. Kiley.** 1980. Virion nucleic acid of Ebola virus. *J Virol* **36**:465-469.
162. **Reid, S. P., L. W. Leung, A. L. Hartman, O. Martinez, M. L. Shaw, C. Carbonnelle, V. E. Volchkov, S. T. Nichol, and C. F. Basler.** 2006. Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J Virol.* **80**:5156-5167.
163. **Richardson, J. S., M. K. Yao, K. N. Tran, M. A. Croyle, J. E. Strong, H. Feldmann, and G. P. Kobinger.** 2009. Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One* **4**:e5308.
164. **Richman, D. D., P. H. Cleveland, J. B. McCormick, and K. M. Johnson.** 1983. Antigenic analysis of strains of Ebola virus: identification of two Ebola virus serotypes. *J Infect Dis* **147**:268-271.
165. **Rollin, P. E., R. J. Williams, D. S. Bressler, S. Pearson, M. Cottingham, G. Pucak, A. Sanchez, S. G. Trappier, R. L. Peters, P. W. Greer, S. Zaki, T. Demarcus, K. Hendricks, M. Kelley, D.**



- Simpson, T. W. Geisbert, P. B. Jahrling, C. J. Peters, and T. G. Ksiazek. 1999. Ebola (subtype Reston) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to the United States. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S108-114.
166. Ruthel, G., G. L. Demmin, G. Kallstrom, M. P. Javid, S. S. Badie, A. B. Will, T. Nelle, R. Schokman, T. L. Nguyen, J. H. Carra, S. Bavari, and M. J. Aman. 2005. Association of ebola virus matrix protein VP40 with microtubules. *Journal of Virology*. **79**:4709-4719.
167. Ryabchikova, E., L. Kolesnikova, M. Smolina, V. Tkachev, L. Pereboeva, S. Baranova, A. Grazhdantseva, and Y. Rassadkin. 1996. Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. *Arch Virol* **141**:909-921.
168. Ryabchikova, E., L. Strelets, L. Kolesnikova, O. Pyankov, and A. Sergeev. 1996. Respiratory Marburg virus infection in guinea pigs. *Arch Virol* **141**:2177-2190.
169. Saeed, M. F., A. A. Kolokoltsov, T. Albrecht, and R. A. Davey. 2010. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog* **6**.
170. Sanchez, A. 2007. Analysis of filovirus entry into vero e6 cells, using inhibitors of endocytosis, endosomal acidification, structural integrity, and cathepsin (B and L) activity. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**:S251-258.
171. Sanchez, A., and M. P. Kiley. 1987. Identification and analysis of Ebola virus messenger RNA. *Virology* **157**:414-420.
172. Sanchez, A., M. P. Kiley, B. P. Holloway, and D. D. Auperin. 1993. Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res* **29**:215-240.
173. Sanchez, A., M. Lukwiya, D. Bausch, S. Mahanty, A. J. Sanchez, K. D. Wagoner, and P. E. Rollin. 2004. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J Virol*. **78**:10370-10377.
174. Sanchez, A., S. G. Trappier, B. W. Mahy, C. J. Peters, and S. T. Nichol. 1996. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**:3602-3607.
175. Schmid, S., D. Mayer, U. Schneider, and M. Schwemmler. 2007. Functional characterization of the major and minor phosphorylation sites of the P protein of Borna disease virus. *J Virol* **81**:5497-5507.
176. Schnittler, H. J., and H. Feldmann. 1999. Molecular pathogenesis of filovirus infections: role of macrophages and endothelial cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. **235**:175-204.
177. Shimojima, M., Y. Ikeda, and Y. Kawaoka. 2007. The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**:S259-263.
178. Shimojima, M., A. Takada, H. Ebihara, G. Neumann, K. Fujioka, T. Irimura, S. Jones, H. Feldmann, and Y. Kawaoka. 2006. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol* **80**:10109-10116.
179. Simmons, G., J. D. Reeves, C. C. Grogan, L. H. Vandenberghe, F. Baribaud, J. C. Whitbeck, E. Burke, M. J. Buchmeier, E. J. Soilleux, J. L. Riley, R. W. Doms, P. Bates, and S. Pohlmann. 2003. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology*. **305**:115-123.
180. Simmons, G., A. J. Rennekamp, N. Chai, L. H. Vandenberghe, J. L. Riley, and P. Bates. 2003. Folate receptor alpha and caveolae are not required for Ebola virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol*. **77**:13433-13438.
181. Simpson, D. I. 1977. Marburg fever. *Nurs Mirror*. **144**:13-15.
182. Sullivan, N. J., T. W. Geisbert, J. B. Geisbert, D. J. Shedlock, L. Xu, L. Lamoreaux, J. H. Custers, P. M. Popernack, Z. Y. Yang, M. G. Pau, M. Roederer, R. A. Koup, J. Goudsmit, P. B. Jahrling, and G. J. Nabel. 2006. Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS Med* **3**:e177.
183. Sullivan, N. J., A. Sanchez, P. E. Rollin, Z. Y. Yang, and G. J. Nabel. 2000. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* **408**:605-609.
184. Sureau, P. H. 1989. Firsthand clinical observations of hemorrhagic manifestations in Ebola hemorrhagic fever in Zaire. *Rev Infect Dis* **11 Suppl 4**:S790-793.
185. Swanepoel, R., S. B. Smit, P. E. Rollin, P. Formenty, P. A. Leman, A. Kemp, F. J. Burt, A. A. Grobbelaar, J. Croft, D. G. Bausch, H. Zeller, H. Leirs, L. E. Braack, M. L. Libande, S. Zaki, S. T.

- Nichol, T. G. Ksiazek, J. T. Paweska, and I. S. a. T. C. f. M. H. F. C. i. t. D. R. o. Congo. 2007. Studies of reservoir hosts for Marburg virus. *Emerg Infect Dis* **13**:1847-1851.
186. Swenson, D. L., D. Wang, M. Luo, K. L. Warfield, J. Woraratanadharm, D. H. Holman, J. Y. Dong, and W. D. Pratt. 2008. Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin Vaccine Immunol* **15**:460-467.
  187. Swenson, D. L., K. L. Warfield, D. L. Negley, A. Schmaljohn, M. J. Aman, and S. Bavari. 2005. Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine* **23**:3033-3042.
  188. Takada, A., K. Fujioka, M. Tsuiji, A. Morikawa, N. Higashi, H. Ebihara, D. Kobasa, H. Feldmann, T. Irimura, and Y. Kawaoka. 2004. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol* **78**:2943-2947.
  189. Takada, A., S. Watanabe, H. Ito, K. Okazaki, H. Kida, and Y. Kawaoka. 2000. Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* **278**:20-26.
  190. Tanmay A. M. Bharat, J. D. R., Larissa Kolesnikova, Sonja Welsch, Verena Kraehling,, and M.-L. P. Norman Davey, Stephan Becker, John A. G. Briggs. 2011. Cryo-Electron Tomography of Marburg Virus Particles and Their Morphogenesis within Infected Cells, *PLoS Biology*.
  191. Theriault, S., A. Groseth, H. Artsob, and H. Feldmann. 2005. The role of reverse genetics systems in determining filovirus pathogenicity. *Arch Virol Suppl*:157-177.
  192. Timen, A., M. P. Koopmans, A. C. Vossen, G. J. van Doornum, S. Günther, F. van den Berkmoortel, K. M. Verduin, S. Ditttrich, P. Emmerich, A. D. Osterhaus, J. T. van Dissel, and R. A. Coutinho. 2009. Response to imported case of Marburg hemorrhagic fever, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* **15**:1171-1175.
  193. Timmins, J., S. Scianimanico, G. Schoehn, and W. Weissenhorn. 2001. Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40. *Virology* **283**:1-6.
  194. Towner, J. S., B. R. Amman, T. K. Sealy, S. A. Carroll, J. A. Comer, A. Kemp, R. Swanepoel, C. D. Paddock, S. Balinandi, M. L. Khristova, P. B. Formenty, C. G. Albarino, D. M. Miller, Z. D. Reed, J. T. Kayiwa, J. N. Mills, D. L. Cannon, P. W. Greer, E. Byaruhanga, E. C. Farnon, P. Atimnedi, S. Okware, E. Katongole-Mbidde, R. Downing, J. W. Tappero, S. R. Zaki, T. G. Ksiazek, S. T. Nichol, and P. E. Rollin. 2009. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog* **5**:e1000536.
  195. Towner, J. S., X. Pourrut, C. G. Albariño, C. N. Nkogue, B. H. Bird, G. Grard, T. G. Ksiazek, J. P. Gonzalez, S. T. Nichol, and E. M. Leroy. 2007. Marburg virus infection detected in a common African bat. *PLoS One* **2**:e764.
  196. Towner, J. S., P. E. Rollin, D. G. Bausch, A. Sanchez, S. M. Crary, M. Vincent, W. F. Lee, C. F. Spiropoulou, T. G. Ksiazek, M. Lukwiya, F. Kaducu, R. Downing, and S. T. Nichol. 2004. Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. *J Virol* **78**:4330-4341.
  197. Towner, J. S., T. K. Sealy, M. L. Khristova, C. G. Albariño, S. Conlan, S. A. Reeder, P. L. Quan, W. I. Lipkin, R. Downing, J. W. Tappero, S. Okware, J. Lutwama, B. Bakamutumaho, J. Kayiwa, J. A. Comer, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, and S. T. Nichol. 2008. Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog* **4**:e1000212.
  198. Tran, T. L., N. Castagné, V. Dubosclard, S. Noinville, E. Koch, M. Moudjou, C. Henry, J. Bernard, R. P. Yeo, and J. F. Eléouët. 2009. The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *J Virol* **83**:6363-6374.
  199. Trunschke, M. 2007. Charakterisierung und Funktionsanalyse der Bindungsdomäne für den Kofaktor VP35 der RNA-Polymerase L des Ebola-Virus. Philipps Universität Marburg, <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2008/0067/>.
  200. Tuffs, A. 2009. Experimental vaccine may have saved Hamburg scientist from Ebola fever. *BMJ* **338**:b1223.
  201. Urata, S., T. Noda, Y. Kawaoka, S. Morikawa, H. Yokosawa, and J. Yasuda. 2007. Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J Virol* **81**:4895-4899.
  202. Usami, K., K. Matsuno, M. Igarashi, K. Denda-Nagai, A. Takada, and T. Irimura. 2011. Involvement of viral envelope GP2 in Ebola virus entry into cells expressing the macrophage galactose-type C-type lectin. *Biochem Biophys Res Commun* **407**:74-78.

203. **van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet,, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner. . 2000.** Virus Taxonomy, VIIth report of the ICTV. Academic Press, San Diego, USA.
204. **Volchkov, V. E., H. Feldmann, V. A. Volchkova, and H. D. Klenk. 1998.** Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:5762-5767.
205. **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, A. A. Chepurinov, V. M. Blinov, O. Dolnik, S. V. Netesov, and H. Feldmann. 1999.** Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J Gen Virol* **80 ( Pt 2)**:355-362.
206. **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, E. Muhlberger, L. V. Kolesnikova, M. Weik, O. Dolnik, and H. D. Klenk. 2001.** Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science.* **291**:1965-1969.
207. **Wamala, J. F., L. Lukwago, M. Malimbo, P. Nguku, Z. Yoti, M. Musenero, J. Amone, W. Mbabazi, M. Nanyunja, S. Zaramba, A. Opio, J. J. Lutwama, A. O. Talisuna, and S. I. Okware. 2010.** Ebola hemorrhagic fever associated with novel virus strain, Uganda, 2007-2008. *Emerg Infect Dis* **16**:1087-1092.
208. **Wang, D., N. U. Raja, C. M. Trubey, L. Y. Juompan, M. Luo, J. Woraratanadharm, S. B. Deitz, H. Yu, B. M. Swain, K. M. Moore, W. D. Pratt, M. K. Hart, and J. Y. Dong. 2006.** Development of a cAdVax-based bivalent ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus. *J Virol.* **80**:2738-2746.
209. **Warfield, K. L., D. L. Swenson, D. L. Negley, A. L. Schmaljohn, M. J. Aman, and S. Bavari. 2004.** Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *Vaccine.* **22**:3495-3502.
210. **Watanabe, S., T. Noda, and Y. Kawaoka. 2006.** Functional mapping of the nucleoprotein of Ebola virus. *J Virol* **80**:3743-3751.
211. **Wauquier, N., P. Becquart, C. Padilla, S. Baize, and E. M. Leroy. 2010.** Human fatal zaire ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis. *PLoS Negl Trop Dis* **4**.
212. **Weik, M., S. Enterlein, K. Schlenz, and E. Mühlberger. 2005.** The Ebola virus genomic replication promoter is bipartite and follows the rule of six. *J Virol* **79**:10660-10671.
213. **Weik, M., J. Modrof, H. D. Klenk, S. Becker, and E. Muhlberger. 2002.** Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation. *J Virol.* **76**:8532-8539.
214. **Weissenhorn, W., A. Carfi, K. H. Lee, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. 1998.** Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol Cell.* **2**:605-616.
215. **Weissenhorn, W., A. Dessen, L. J. Calder, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. 1999.** Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol.* **16**:3-9.
216. **Welsch, S., L. Kolesnikova, V. Krähling, J. D. Riches, S. Becker, and J. A. Briggs. 2010.** Electron tomography reveals the steps in filovirus budding. *PLoS Pathog* **6**:e1000875.
217. **Whelan, S. P. 2008.** Response to "Non-segmented negative-strand RNA virus RNA synthesis in vivo". *Virology* **371**:234-237.
218. **Whelan, S. P., J. N. Barr, and G. W. Wertz. 2004.** Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**:61-119.
219. **WHO. 1978.** Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team. *Bull World Health Organ.* **56**:247-270.
220. **WHO. 1978.** Ebola Hemorrhagic Fever in Zaire. *Bull World Health Organ.* **56**:271-293.
221. **Wool-Lewis, R. J., and P. Bates. 1998.** Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J Virol.* **72**:3155-3160.
222. **Yang, J., J. S. Hwang, H. Camakaris, W. Irawaty, A. Ishihama, and J. Pittard. 2004.** Mode of action of the TyrR protein: repression and activation of the tyrP promoter of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **52**:243-256.
223. **Yang, Z. Y., H. J. Duckers, N. J. Sullivan, A. Sanchez, E. G. Nabel, and G. J. Nabel. 2000.** Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat Med.* **6**:886-889.
224. **Yonezawa, A., M. Cavois, and W. C. Greene. 2005.** Studies of ebola virus glycoprotein-mediated entry and fusion by using pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 virions: involvement of cytoskeletal proteins and enhancement by tumor necrosis factor alpha. *J Virol* **79**:918-926.

225. **Zaki, S. R., and C. J. Peters.** 1997. Viral Hemorrhagic Fever. In: Diagnostic Pathology of Infectious Diseases (Connor, D. H., Chandler, F. W., Schwartz, D. A., Manz, H. J., Lack, E. E., eds.). Appleton and Lange, Stamford, USA:347-64.
226. **Zaki, S. R., W. J. Shieh, P. W. Greer, C. S. Goldsmith, T. Ferebee, J. Katshitshi, F. K. Tshioko, M. A. Bwaka, R. Swanepoel, P. Calain, A. S. Khan, E. Lloyd, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, and C. J. Peters.** 1999. A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola hemorrhagic fever. Commission de Lutte contre les Epidémies à Kikwit. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S36-47.

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Taxonomie von Filoviren.....	1
Abbildung 2: Epidemiologie von Filovirus-Infektionen .....	3
Abbildung 3: Morphologie von EBOV.....	6
Abbildung 4: Vermehrungszyklus von EBOV .....	8
Abbildung 5: Infektiöser <i>virus-like particle</i> (iVLP)-Assay .....	12
Abbildung 6: Generierung von rekombinantem EBOV .....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung des EBOV VP30.....	15
Abbildung 8: Schematische Darstellung der VP30 Phosphorylierungsmutanten. ....	49
Abbildung 9: Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die virale Transkription.....	51
Abbildung 10: Inhibitorischer Einfluss des VP30_DD auf die virale Transkription in Anwesenheit von VP30_wt .....	52
Abbildung 11: Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die virale Replikation. A. Einfluss der VP30 Phosphorylierung auf die virale Replikation in VLP-Synthesezellen.....	54
Abbildung 12: Einfluss der VP30 Phosphorylierungsmutanten auf die Homooligomerisierung mit VP30_wt.....	56
Abbildung 13: Interaktion der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit NP.....	57
Abbildung 14: Die Bedeutung der VP30-NP Interaktion für die virale Transkription .....	59
Abbildung 15: Interaktion von VP30 mit VP35.....	61
Abbildung 16: Interaktion der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit VP35 .....	63
Abbildung 17: Charakterisierung der VP30 Phosphorylierungsmutanten mit NP in der Immunfluoreszenzanalyse .....	65
Abbildung 18: Einfluss singulärer Serinreste des VP30 auf den viralen Replikationszyklus .....	66
Abbildung 19: Schematische Darstellung der rekombinanten EBOV .....	68
Abbildung 20: Rescue von recEBOV_S29 und recEBOV_S30 .....	70
Abbildung 21: Morphologische Charakterisierung der recEBOV.....	72
Abbildung 22: Wachstumskinetik von recEBOV bei niedriger MOI .....	73
Abbildung 23: Wachstumskinetik von recEBOV bei hoher MOI .....	74
Abbildung 24: Reversionen des recEBOV_S30.....	76
Abbildung 25: Charakterisierung eines phosphospezifischen VP30_S29 Peptidantikörpers nach rekombinanter Expression .....	78
Abbildung 26: Charakterisierung der Phosphorylierung des VP30_S29 nach Co-Expression mit NP in der Immunfluoreszenzanalyse.....	80
Abbildung 27: Charakterisierung der phosphospezifischen VP30_S29 Peptidantikörper nach Infektion mit recEBOV_S29.....	82

Abbildung 28: Lokalisation von VP30_S29 und NP in viralen Einschlusskörpern. ....	83
Abbildung 29: Lokalisation des phosphorylierten VP30_S29 und des Gesamt-VP30_S29 in viralen Einschlusskörpern.....	84
Abbildung 30: Färbung des phosphorylierten VP30_S29, Gesamt-VP30 sowie NP in viralen Einschlusskörpern .....	85
Abbildung 31: Schema des Modells für die Transkriptions- und Replikationsregulation durch die Phosphorylierung des VP30. ....	95
Tabelle 1: Verwendete Plasmide.....	25
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper. ....	26
Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper. ....	26

## 10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den international verbindlichen Normen. Die Abkürzungen der chemischen Substanzen wurden im Materialteil aufgeführt.

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BEBOV	Bundibugyo Ebolavirus
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSL-4	<i>biosafety level</i> , Biologisches Schutzstufe 4
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> , Atlanta (USA)
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CIEBOV	Côte d'Ivoire (Elfenbeinküste) Ebolavirus
CoIP	Coimmunpräzipitation
CPE	<i>cytopathic effect</i> , Zytopathischer Effekt
C-Terminus	Carboxyterminus
d (bei dH <sub>2</sub> O)	deionisiert
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin</i>
DC-SIGNR	<i>dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin related protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EBOV	Ebolavirus
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat Isomer 1
for	<i>forward</i> , forwards
GP	Glycoprotein
h	Stunden
HEK293	humane embryonale Nierenzellen
HUH 7	humane Hepatomazellen
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
iVLP	<i>infectious virus-like particle</i> , infektiöse Virus-ähnliche Partikel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L (-Protein)	<i>Large-Protein</i> (Polymerase L)
LB (-Medium)	<i>lysogeny broth</i>
MARV	Marburgvirus
Min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>multi vesicular bodies</i> , multivesikuläre Strukturen
Nedd4	<i>neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4</i>
NP	Nukleoprotein
N-Terminus	Aminoterminal

OD	Optische Dichte
p.i.	<i>post infectionem</i> , nach der Infektion
p.t.	<i>post transfectionem</i> , nach der Transfektion
P/S	Penicilin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PP	Probenpuffer
REBOV	Reston Ebolavirus
recEBOV	Rekombinantes Ebolavirus
rev	<i>reverse</i> , rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
rNAPc2	<i>recombinant nematode anticoagulant protein c2</i> , rekombinanter Inhibitor des Gewebefaktors VIIa
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEBOV	Sudan Ebolavirus
sec	Sekunden
sGP	<i>soluble GP</i> , lösliches GP
ssGP	<i>small soluble GP</i> , kleines lösliches GP
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TNF	Tumornekrosefaktor
Tsg101	<i>tumor susceptibility gene 101</i>
U	<i>units</i> , Einheiten
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VP	Virusprotein
vRNA	virale RNA
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
wt	<i>Wildtyp</i>
ZEBOV	Zaire Ebolavirus
α	anti
λ	<i>Lamda</i> , Wellenlänge



## 11 LEBENSLAUF

### PERSÖNLICHE ANGABEN

Nadine Biedenkopf  
 Wilhelmstraße 19a  
 35037 Marburg  
 Geboren am 11.11.1981 in Laubach (Hessen)

### AUSBILDUNG

- |                       |  |
|-----------------------|--|
| seit 07 / 2007        | Promotion<br>Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg<br>Betreuer: Prof. Dr. Stephan Becker  |
| seit 10 / 2008        | Training und Arbeiten im BSL-4 ( <i>biosafety level 4</i> ) Hochsicherheitslabor<br>Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg   |
| 07 / 2006 - 06 / 2007 | Diplomarbeit<br>• Die Rolle der Phosphorylierung des VP30 für die initiale virale Transkription und die Lokalisation der VP30-Interaktionsdomäne auf dem Nukleoprotein •<br>Robert Koch Institut, Zentrum für Biologische Sicherheit, Berlin<br>Betreuer: Prof. Dr. Stephan Becker |
| 10 / 2001- 06 / 2007  | Studium der Humanbiologie<br>Philipps-Universität Marburg<br>• Hauptfach: Infektionsbiologie<br>• Nebenfach: Humangenetik  |
| 10 / 2004 - 03 / 2005 | <i>Erasmus</i> Auslandsemester<br>Università degli Studi del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro<br>• Studium der Biotechnologie •<br>Novara, Italien   |
| 06 / 2001             | Abitur an der Theo-Koch-Schule Grünberg, Hessen  |

### STIPENDIEN UND MITGLIEDSCHAFTEN

- |                       |   |
|-----------------------|---|
| 03 / 2011             | • Reisestipendium zur Teilnahme an der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Freiburg • Gesellschaft für Virologie |
| 2009 - 2011           | • Mentee •<br><i>SciMento</i> Mentoring Organisation für Frauen in Naturwissenschaften                                      |
| 06 / 2010             | • Reisestipendium zur Teilnahme am Negative Strand Virus Meeting in Brügge, Belgien • GlaxoSmithKline GSK Stiftung          |
| 07 / 2008 - 06 / 2010 | • Doktorandenstipendium • Schering Stiftung   |
| 08 / 2008             | • Reisestipendium zur Teilnahme am XVII. Internationalen Kongress für Virologie in Istanbul • Gesellschaft für Virologie    |
| seit 2008             | Mitglied der Gesellschaft für Virologie e.V.  |

## 12 VERÖFFENTLICHUNGEN

### PUBLIKATIONEN

\* geteilte Erstautorenschaft

- 11 / 2011      • Phosphorylation of Marburg virus NP region II modulates viral RNA synthesis •  
Andrea Di Carlo\*, Nadine Biedenkopf\*, Bettina Hartlieb, Anja Klußmeier, Stephan Becker  
Journal of Infectious Diseases, November 2011, Vol. 204, Issue Suppl 3: p S927-933
- 11 / 2011      • Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis •  
Paulina Aleksandrowicz, Andrea Marzi, Nadine Biedenkopf, Nadine Beimforde, Stephan Becker, Thomas Hoenen, Heinz Feldmann, Hans-Joachim Schnittler  
Journal of Infectious Diseases, November 2011, Vol. 204, Issue Suppl 3: pS957-967
- 07 / 2010      • Oligomerization of Ebola virus VP40 is essential for particle morphogenesis and regulation of viral transcription •  
Thomas Hoenen, Nadine Biedenkopf, Florian Zielecki, Stephanie Jung, Allison Groseth, Heinz Feldmann, Stephan Becker  
Journal of Virology, July 2010, p. 7053-7063, Vol. 84, No. 14
- 12 / 2008      • Role of Ebola virus VP30 in Transcription Reinitiation •  
Miguel J. Martinez\*, Nadine Biedenkopf\*, Valentina Volchkova, Bettina Hartlieb, Nathalie Alazard-Dany, Olivier Reinard, Stephan Becker, Viktor Volchkov  
Journal of Virology, December 2008, p. 12569-12573, Vol. 82, No. 24

### KONGRESSBEITRÄGE

\* Präsentierender Autor

- 03 / 2011      • Dynamic phosphorylation of Ebola virus VP30 serine 29 is essential and sufficient for primary viral transcription •  
Nadine Biedenkopf\* and Stephan Becker  
Vortrag, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Freiburg
- 03 / 2011      • Studying the molecular biology of filoviruses using reverse genetics •  
Nadine Biedenkopf\*  
Vortrag, DAAD Austausch mit Bolivien, Marburg
- 06 / 2010      • Primary viral transcription of Ebola Virus is dependent on dynamic phosphorylation of VP30 •  
Nadine Biedenkopf\* and Stephan Becker  
Posterpräsentation, Negativ Strand Virus Meeting, Brügge, Belgien

- 04 / 2010 • Oligomerization of Ebola virus VP40 is essential for the formation of infectious virus-like particles •  
Thomas Hoenen\*, Nadine Biedenkopf, Stephanie Jung, Florian Zielecki, Allison Groseth, Heinz Feldmann and Stephan Becker  
Posterpräsentation, Internationales Filovirus Meeting, Tokyo, Japan
- 09 / 2009 • EBOV VP40 homooligomerization is essential for the formation of virus-like particles •  
Thomas Hoenen\*, Nadine Biedenkopf, Stephanie Jung, Florian Zielecki, Allison Groseth, Heinz Feldmann and Stephan Becker  
Posterpräsentation, Internationales Symposium des SFB 593, Marburg
- 08 / 2009 • Entry of Ebola virus into target cells •  
Paulina Aleksandrowicz\*, Nadine Biedenkopf, Stephan Becker, Heinz Feldmann, Hans Joachim Schnittler  
Vortrag, Conference on the Infection of the endothelium, Dresden
- 07 / 2009 • Dynamic Phosphorylation of Ebola Virus VP30 is required for Primary Viral Transcription •  
Nadine Biedenkopf\*, Bettina Hartlieb, Stephan Becker  
Vortrag, Jahrestagung der American Society for Virology, Vancouver, Kanada
- 03 / 2009 • Dynamic Phosphorylation of Ebola Virus VP30 is required for Primary Viral Transcription •  
Nadine Biedenkopf\*, Bettina Hartlieb, Stephan Becker  
Vortrag, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Leipzig
- 08 / 2008 • Characterization of the Ebola virus VP30 – NP interaction •  
Nadine Biedenkopf\*, Bettina Hartlieb, Stephan Becker  
Vortrag, XVII. Internationaler Kongress für Virologie, Istanbul, Türkei
- 03 / 2008 • Characterization of the Ebola virus VP30 – NP interaction •  
Nadine Biedenkopf\*, Bettina Hartlieb, Stephan Becker  
Vortrag, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Heidelberg
- 09 / 2007 • Characterization of Ebola virus VP30 phosphorylation •  
Nadine Biedenkopf\*, Bettina Hartlieb, Stephan Becker  
Posterpräsentation, European Congress of Virology, Nürnberg
- 07 / 2007 • Phosphorylation of Ebola Virus VP30 •  
Nadine Biedenkopf\*, Stephan Becker  
Vortrag, Robert Koch Institut, Berlin

## 13 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer an der Philipps Universität Marburg waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten:

Becker, Besedovsky, Dalpke, Daut, del Rey, Eilers, Elsässer, Feuser, Garten, Gudermann, Hasilik, Jacob, Jungclas, Kirchner, Klenk, Koolman, Lang, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Maisner, Müller, Petz, Renkawitz-Pohl, Renz, Röhm, Röper, Schäfer, Weihe, Westermann

## 14 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

### **Die Phosphorylierung des Ebolavirus VP30 reguliert die virale Transkription und Replikation**

im Institut für Virologie unter Leitung von Prof. Dr. Stephan Becker ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

---

Nadine Biedenkopf

---

Ort, Datum

## 15 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen von Herzen danken, die mir während meiner Promotion zur Seite standen, die mir unermüdlich geholfen und mich immer unterstützt und ermutigt haben:

**Vielen vielen Dank an:**

...Prof. Dr. Stephan Becker: für Deine wertvollen Ideen und Anregungen, Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und Dein Vertrauen in meine Fähigkeiten und dafür, dass Du Dir zwischendurch immer wieder Zeit für mich genommen hast, die Du vermutlich gar nicht hattest!

...das gesamte Institut für Virologie: für die tolle Gemeinschaft, für die vielen lustigen Tagungen, für die kreativen Magnetbilder und dafür, dass man mit Fragen jeglicher Art immer willkommen ist! Besonders an Markus Eickmann, Gotthard Ludwig und Michael Schmidt für das unkomplizierte Arbeiten im roten Klotz!

...die AG Becker: Dirk Becker, Anne Brüggemann, Olga Dolnik, Astrid Herwig, Michael Klüver, Katharina Kowalski, Larissa Kolesnikova, Verena Krähling, Eva Mittler, Gordian Schudt, Hosam Shams-Eldin und Svenja Wolff und alle ehem. Kollegen (v.a. Allison Groseth, Thomas Hoenen, Jörg Wenigenrath): für eure Ratschläge, Hilfsbereitschaft und Aufmunterung an guten wie an schlechten Tagen, für den ewigen Nachschub an Kaffee, Milch und Schokolade, für die wolkenlosen AG-Ausflüge, für die lustigen Freitags-Nachmittags-Syndrome (gelegentlich auch schon Dienstags...)! Danke vor allem an Eva, die mit mir zusammen „unser Labor schmeißt“ ;-)  
für den Spaß und die Geduld mit mir, wenn ich mal wieder meine 5 Minuten habe und sie mit deutscher Musik quäle. Ohne euch hätten die letzten Jahre nur halb so viel Spaß gemacht!

...meine WG: Ayşe, Carina, Nico und Pepe: für die vielen lustigen Siedlerspiele, für gemütliche Frühstücke mit perfektem Ei und das Gefühl zu Hause zu sein, wenn man zur Tür hereinfällt!

...meine Freunde: Alida, Antonella, Anne, Ayşe, Carina, 2x Caro, Claudia, Doro, Eva, Jessi und Lilli: dafür, dass ihr mir zeigt, was neben Labor und Experimenten wirklich wichtig ist im Leben, für eure Unterstützung in allen Lebenslagen und dafür, dass wir gemeinsam so viel Spaß haben können!

...Christopher: für die Ruhe und Gelassenheit, die Du in mein Leben bringst und die sich manchmal auf mich überträgt, für die beeindruckende Wiederherstellung dieses Dokumentes, nachdem ich alles fast zunichte formatiert hatte und natürlich noch für ganz viel mehr!

...meine Familie: euch gebührt natürlich der größte Dank! Danke für eure Unterstützung über die Jahre weg und euren Glauben an mich, dass ich das schon irgendwie hinkriegen werde!